TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# NANOMALZEME YÜKLÜ KÖK HÜCRE KAYNAKLI EKSOZOMLARIN KANSER HÜCRELERİNDE FOTODİNAMİK TERAPİ ETKİSİ

**Ömür BEŞBINAR**

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP**
**ANABİLİM DALI**
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**
**Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA**

**ANKARA**
**2024**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# NANOMALZEME YÜKLÜ KÖK HÜCRE KAYNAKLI EKSOZOMLARIN KANSER HÜCRELERİNDE FOTODİNAMİK TERAPİ ETKİSİ

**Ömür BEŞBINAR**

**DİSİPLİNLERARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP**
**ANABİLİM DALI**
**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**
**Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA**

**ANKARA**
**2024**

# ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Nanomalzeme Yüklü Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Kanser Hücrelerinde Fotodinamik Terapi Etkisi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ömür BEŞBINAR

Tarih: 22.10.2024

İmza:

# KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalında
Ömür BEŞBINAR tarafından hazırlanan "Nanomalzeme Yüklü Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Kanser Hücrelerinde Fotodinamik Terapi Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.10.2024

İmza
Prof. Dr. Asuman ÖZEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza
Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Gökçen DEMİREL
Hacı Bayram Veli Üniversitesi
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# ÖZET


**Nanomalzeme Yüklü Kök Hücre Kaynaklı Eksozomların Kanser Hücrelerinde Fotodinamik Terapi Etkisi**

Eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan ekstraselüler veziküllerdir. Salgılanmış oldukları hücrelere ait protein, nükleik asit ya da eksojen parçacıkları hedef hücreye taşıyabilen önemli iletişim araçlarıdır. Düşük immünojeniteleri, nano boyutları, biyolojik bariyerlerden kolaylıkla geçebilmeleri ve sistemik dolaşımdaki uzun süreli stabiliteleri onları ilaç taşıma sistemlerinin odağı haline getirmiştir. Karbon Dot'lar, 2-3 nm boyutlarındaki yapıları, kırmızı floresan özellikleri ve terapötik yetenekleri ile tanı ve tedavi yaklaşımlarında gelecek vaat eden nanomalzemelerdir. Terapötik ajanların hedef bölgede birikimi, derin doku penetrasyonu ve hücre internalizasyonu, kanser tedavisindeki başarıyı doğrudan etkileyen kritik faktörlerdir. İlaç taşıma sistemleri, taşınan kargoyu denatürasyon ve eliminasyon gibi dış etkenlerden koruyarak ve hedef bölgedeki birikimini artırıp, yan etkileri azaltarak tedavi etkinliğini yükseltmeyi hedeflemektedir. Bu tez çalışmasında; Mezenkimal Kök Hücre kaynaklı eksozomlar aracılığı ile taşınan Karbon Dot' ların kanser hücrelerindeki Fotodinamik Terapi etkisi araştırılmıştır. Karbon Dot yüklü eksozomların karakterizasyonu için TEM, STEM, NTA, ve Akış Sitometri tekniklerinden faydalanılmıştır. Kanser hücre hatlarında eksozom aracılı Fotodinamik Terapi verimliliği *in vitro* ve *in vivo* deney sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Karbon Dot' ların, düşük toksisite, yüksek terapötik etki ve yoğun floresan özellikleri ile tedavi ve görüntüleme sistemleri için oldukça elverişli oldukları düşünülmektedir. Ayrıca, serbest malzeme uygulamasına kıyasla, eksozomlar aracılığı ile taşınan Karbon Dot' ların tedavi verimliliğinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir.



**Anahtar Sözcükler:** Eksozom, Fotodinamik Terapi, İlaç Taşıma Sistemleri, Karbon Dot, Nanomalzeme

# SUMMARY


## The Photodynamıc Therapy Efficacy Of Nanomaterıal Loaded Stem Cell-Derıved Exosomes In Cancer Cell

Exosomes are extracellular vesicles secreted by cells. They are crucial communication tools that can transfer proteins, nucleic acids, or exogenous particles from the cells they originate from to target cells. Their low immunogenicity, nanoscale size, ability to easily pass through biological barriers, and long-term stability in systemic circulation have made them the focus of drug delivery systems. Carbon Dots, with their 2-3 nm size, red fluorescent properties, and therapeutic capabilities, are promising nanomaterials for diagnostic and therapeutic approaches. The accumulation of therapeutic agents in the target area, deep tissue penetration, and cellular internalization are critical factors that directly influence the success of cancer treatment. Drug delivery systems aim to enhance treatment efficacy by protecting the transported cargo from external factors such as denaturation and elimination, while also increasing accumulation in the target area and reducing side effects. In this thesis, the Photodynamic Therapy effect of Carbon Dots delivered via Mesenchymal Stem Cell-derived exosomes on cancer cells was investigated. TEM, STEM, NTA, and Flow Cytometry techniques were utilized for the characterization of exosomes loaded with Carbon Dots. The efficiency of exosome-mediated photodynamic therapy was evaluated based on *in vitro* and *in vivo* experimental results in cancer cell lines. Carbon Dots, with their low toxicity, high therapeutic effect, and strong fluorescent properties, are considered highly suitable for therapeutic and imaging systems. Furthermore, compared to the treatment of free materials, a significant increase in therapeutic efficiency was observed when Carbon Dots were delivered via exosomes.



**Keywords:** Carbon Dot, Drug Delivery Systems, Exosome, Nanomaterial, Photodynamic Therapy

# İÇİNDEKİLER


Etik Beyan ii
Kabul ve Onay iii
Özet iv
Summary v
İçindekiler vi
Önsöz viii
Simgeler ve Kısaltmalar x
Şekiller xii
Çizelgeler xvi

**1. GİRİŞ** 1
1.1.Eksozomlar 1
1.1.1.Eksozom Biyosentezi ve İçeriği 1
1.1.2.Eksozomların Hedef Belirleme ve İnternalizasyon Mekanizmaları 4
1.1.3. Eksozomların Kullanım Alanları 6
1.1.4. Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ve Kanser Uygulamaları 11
1.2. Nanomalzemeler 13
1.2.1. Nanomalzemelerin Sınıflandırılması 13
1.2.2. Kanser Çalışmalarında Nanomalzemelerin Yeri 14
1.2.3. Nanomalzeme Enkapsülasyonunun Önemi 15
1.2.4. Karbon Dotlar 16
1.2.4.1. Karbon Dot Sentezi ve Özellikleri 16
1.2.4.2. Karbon Dot'ların Hücre İnternalizasyonu 18
1.3. Fotodinamik Terapi 20
1.3.1. Fotodinamik Terapi ve Nanomalzemeler 20
1.3.2. Eksozom Aracılı Fotodinamik Terapi 21

**2. GEREÇ ve YÖNTEM** 23
2.1. Karbon Dot Sentezi ve Karakterizasyonu 23
2.1.1. Karbon Dot Sentezi 23
2.1.2. Karbon Dot' ların Optik Özelliklerinin Değerlendirilmesi 23
2.1.3. Karbon Dot Solüsyonlarındaki Bakır İçeriğinin Analizi 25
2.1.4. Karbon Dot' ların Morfolojik Yapısının İncelenmesi 26
2.2. Karbon Dot'ların Hücre İnternalizasyonu 27
2.2.1. Karbon Dot İnternalizasyonunun Görüntülenmesi 27
2.2.2. Karbon Dot İnternalizasyonunun Nicel Analizi 27
2.2.3. Karbon Dot Kaynaklı Bakır Miktarının Ölçümü 28
2.3. Karbon Dot'ların *in vitro* PDT Yanıtının Değerlendirilmesi 29
2.3.1. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları 29
2.3.2 Karbon Dot'ların Hücre Canlılığına Etkisi 30
2.3.3. Kanser Hücrelerinde *in vitro* Fotodinamik Terapi Uygulaması 31
2.3.4. Apoptoz, Hücre Döngüsü ve ROS Oluşumlarının Değerlendirilmesi 32
2.4. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu 34
2.4.1. Eksozom İzolasyonu 34
2.4.2. Eksozomların Total Protein Miktar Tayini 35
2.4.3. Eksozom Morfolojilerinin İncelenmesi 36
2.4.4. Eksozom Partikül Boyutu Dağılım Analizi 37
2.4.5. Eksozom Belirteç İfadelerinin Analizi 38
2.4.6. Eksozomların Chl-CD Yüklenme Kapasitesinin Hesaplanması 39
2.5. Eksozom Aracılı PDT Yanıtının Değerlendirilmesi 40
2.5.1. Eksozomların Kanser Hücresine İnternalizasyonu 40
2.5.2. Eksozom Aracılı PDT Uygulaması 40

2.6. *İn Vivo* Fotodinamik Terapi Çalışmaları 41
2.7. İstatistiksel Analizler 43

**3. BULGULAR** 44
3.1. Karbon Dot Karakterizasyonu 44
3.1.1. UV-VİS ve PL Spektroskopileri 44
3.1.2. MP-AES 45
3.1.3. TEM, STEM ve HR-TEM 46
3.2. Karbon Dot İnternalizasyonunun Değerlendirilmesi 47
3.2.1. Konfokal Mikroskop 47
3.2.2. Akış Sitometri 48
3.2.3. ICP-MS 50
3.3. *In Vitro* PDT Çalışmaları 51
3.3.1. Hücre Kültürü 51
3.3.2. Karbon Dot' ların Hücre Canlılığına Etkisi 52
3.3.3. Karbon Dot'ların Fotodinamik Terapi Etkisi 53
3.3.4. Apoptoz, Hücre Döngüsü ve ROS oluşumu 56
3.4. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu 59
3.4.1. BCA Analizi 59
3.4.2. TEM, STEM-EDX ve HR-TEM 60
3.4.3. NTA 62
3.4.4. Akış Sitometri 63
3.4.5. Absorbans Spektroskopisi 63
3.5. Eksozom Aracılı Fotodinamik Terapi Yanıtının Değerlendirilmesi 65
3.5.1. Eksozomların Kanser Hücre İnternalizasyonu 65
3.5.2. Eksozomların Hücre Canlılığına Etkisi 65
3.5.3. Eksozom Aracılı Fotodinamik Terapi 68
3.6. Chl-CD Biyodağılımı, Tümör Boyutları ve Histolojik İncelemeler 72
3.6.1. Serbest Chl-CD ve Eksozomların Biyodağılımı 72
3.6.2. Tümör Boyutları 74
3.6.3. Histolojik İncelemeler 76

**4. TARTIŞMA** 79
**5. SONUÇ ve ÖNERİLER** 91
**KAYNAKLAR** 94
**EKLER** 118
**EK-1.** Etik Kurul Kararı 118
**ÖZGEÇMİŞ** 119

# ÖNSÖZ

Sağladığı tüm imkanlar ve sonsuz desteği için, bana benden çok güvenen danışman hocam Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA' ya,

Değerli katkılarından dolayı, Tez İzleme Komite üyelerimiz Prof. Dr. Asuman ÖZEN ve Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI' ya,

Bir yıllık yurtdışı deneyimimde beni hiç yalnız bırakmayan, başta Prof. Dr. Jesus SANTAMARIA olmak üzere, PhD. Ana Martin Pardillos, PhD. Jose Luis Hueso Martos ve tüm NFP Araştırma Grubu üyelerine,

Karbon Dot sentezini ve Türkiye-İspanya transferlerini hassasiyetle gerçekleştiren, tüm sorularımı sabırla cevaplayan Dr. Emel Kirbas Cilingir' e,

Tez deneylerimin akışında desteklerini benden hiç esirgemeyen Doç. Dr. Ahmet CEYLAN, Doç. Dr. Ceylan Verda BİTİRİM, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Altay ÜNAL ve Prof. Dr. Okan EKİM hocalarıma;

Lisans eğitimimden bu yana hep birlikte ilerlediğimiz değerli hocalarım Doç. Dr. Esin AKBAY ÇETİN ve Dr. Öğr. Üyesi Handan SEVİM AKAN' a,

Stresin kahkahaya dönüştüğü tüm keyifli anılarımız ve dostlukları için Arş. Gör. Recep UYAR, Doğantan ÇELİK ve tez dertlerimle bıktırdığım tüm arkadaşlarıma,

Zamanımın, bilgimin, enerjimin yetmediği her an yardımıma koşan Aydan FÜLGEN AĞAN, Damla ALKAYA SEZGİN, Gökçe Yağmur SUMMAK, Gül KAYA KÜÇÜK, Gülsüm AYTEN ve tüm YILMAZERLAB ekibine ve tabi ki AKÇALI gruba,

Bana, çok güzel bir ailede büyüme imkânı verdikleri için, canım Annem Aysel BUL, kıymetli Babam Ertuğrul BUL ve bitanecik Ablam Ezgi SERDAROĞLU' na ve tüm yokluklarımda gönül rahatlığıyla ailemi emanet ettiğim Annem Zübeyde BEŞBINAR'a,

Her düştüğümde beni toparlayan, sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan fedakâr eşim Serkan BEŞBINAR'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak; yurtiçi, yurtdışı her zorluğa ayak uyduran, uyumlu, anlayışlı ve dünya tatlısı yol arkadaşım, en büyük TEŞEKKÜR SANA! Oğlum Mehmet Çınar BEŞBINAR' a.

Doktora öğrenciliğimi YOK100/2000 Ayrıcalıklı Alan Bursu ile destekleyen YÖK' e ve 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu ile yurtdışında araştırma yapma imkanı sağlayan TÜBİTAK' a teşekkürü borç bilirim.

*Annem'e…*

# SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---|---|
| 4T1 | Fare Meme Kanser Hücre Hattı |
| A549 | İnsan Akciğer Kanser Hücre Hattı |
| AB | Apoptotik Cisimcik |
| AD-MKH | Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre |
| BCA | Bikinçoninik Asit |
| CD | Karbon Dot |
| CD@$EXO_{MKH}$ | Karbon Dot yüklü MKH Eksozomları |
| Chl-CD | Klorofil Kaynaklı Karbon Dot |
| dk | Dakika |
| DMEM | Dulbecco' nun Modifiye Edilmiş Besiyeri |
| EDX | Enerji Dağıtıcı X-Işını |
| EPR | Arttırılmış Geçirgenlik ve Tutulma |
| ESCRT | Taşıma İçin Gerekli Endozomal Sıralama Kompleksi |
| EV | Ekstraselüler Vezikül |
| $EXO_{MKH}$ | Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları |
| FBS | Fetal Sığır Serumu |
| GSH | Glutatyon |
| HD | Hücre Döngüsü |
| hpMKH | İnsan Plasental Mezenkimal Kök Hücre |
| HR-TEM | Yüksek Çözünürlük Transmisyon Elektron Mikroskobu |
| ICP-MS | İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi |
| ILV | İntralüminal Vezikülleri |
| IVIS | *İn vivo* Görüntüleme Sistemi |
| İDM | İlaç Direnç Mekanizmalarının |
| KBB | Kan Beyin Bariyeri |
| Kİ-MKH | Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre |
| LDH | Laktat Dehidrogenaz |
| miRNA | MikroRNA |
| MKH | Mezenkimal Kök Hücre |
| µm | Mikrometre |
| MP-AES | Mikrodalga Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi |
| MV | Mikroveziküller |
| MVB | Multiveziküler Cisim |
| NM | Nanomalzemeler |
| nm | Nanometre |
| NTA | Nanomalzeme Takip Analizi |

| | |
|---|---|
| PC | Protein Korona |
| PDT | Fotodinamik Terapi |
| PL | Fotolüminesans Spektroskopi |
| PS | Fotosensitizer |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri |
| STEM | Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu |
| TEM | Transmisyon Elektron Mikroskobu |
| TME | Tümör Mikro Çevresi |
| U251 | İnsan Glioblastoma Kanser Hücre Hattı |
| U87 | İnsan Glioblastoma Kanser Hücre Hattı |
| UK-MKH | Umblikal Kord Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre |
| UV-VIS | Ultraviyole- Görünür Spektroskopi |

# ŞEKİLLER

**Şekil 1.1.** Eksozom biyosentez aşamaları. 2
**Şekil 1.2.** Eksozom bileşenleri 3
**Şekil 1.3.** Eksozomların alıcı hücre tarafından hücreye alınma yolları 5
**Şekil 1.4.** Nanomalzemelerin, boyutlarına göre sınıflandırılması. 13
**Şekil 1.5.** Karbon Dot'un şematik görünümü. 17
**Şekil 1.6.** Fotodinamik Terapi mekanizmasının şematize edilmesi 20
**Şekil 2.1.** Fotolüminesans Spektroskopide Eksitasyon, Absorbsiyon ve Emisyonu tanımlarının şematik gösterimi. 24
**Şekil 2.3.** TEM ızgaralarının hazırlanması. 26
**Şekil 2.4.** *İn vitro* Fotodinamik Terapi düzeneği. 31
**Şekil 2.5.** Apoptoz tayin kitinin çalışma prensibi 32
**Şekil 2.6**. Eksozom izolasyon basamakları 35
**Şekil 2.7.** Eksozom yüklenen TEM ızgaralarının hazırlık aşaması 37
**Şekil 2.8**. MACSPlex eksozom karakterizasyon kitinin çalışma prensibi. 38
**Şekil 2.9.** PBS içinde hazırlanan Chl-CD seri dilüsyonları 39
**Şekil 2.10**. *İn vivo* deney akış şeması: A. Serbest Chl-CD aracılı-PDT B. Eksozom aracılı-PDT. 42
**Şekil 2.11**. Tez Akış Şeması. 43
**Şekil 3.1.** Chl-CD' ların optik özellikleri: A. Absorbans değerlerinin UV-Vis' de ölçümü, B. Eksitasyon ve emisyon değerlerinin PL Spektroskopisi'nde ölçümü. 44
**Şekil 3.2.** Chl-CD içerik analizi: MP-AES ile Bakır elementinin miktar ölçümü. 45
**Şekil 3.3.** Chl-CD' ların morfolojik yapısı: TEM görüntüsü ve boyut dağılımı 46
**Şekil 3.4.** Chl-CD' ların elemental analizi: STEM görüntüsü ve Bakır sinyallerinin EDX analizi. 46
**Şekil 3.5**. Chl-CD' ların kristalin yapısı: HR-TEM görüntüsü ve kafes boşlukları. 47
**Şekil 3.6**. Chl-CD internalizasyonu: Kanser hücreleri, cam tabanlı hücre kültür kaplarına 300.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, 100 ug/ml Chl-CD ile 4 saat inkübe edildikten sonra, Fenol Kırmızısı içermeyen besiyerinde canlı olarak, Konfokal Mikroskobu ile görüntülenmiştir (Ölçek çizgisi 50 μm). 48
**Şekil 3.7.** Farklı konsantrasyonlardaki Chl-CD internalizasyonu: Hücreler, 150.000 hücre/ kuyu olacak şekilde 12 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda Chl-CD ile inkübe edilmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından internalizasyon, Akış Sitometrisi ile değerlendirilmiştir. 49
**Şekil 3.8.** Farklı inkübasyon sürelerinde Chl-CD İnternalizasyonu: Hücreler, 150.000 hücre/ kuyu olacak şekilde 12 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, 50 μg/ml Chl-CD ile farklı sürelerde inkübe edilmiştir. İnternalizasyon, Akış Sitometrisi' nde değerlendirilmiştir. (hpMKH ve U251 hücrelerinin floresan yoğunlukları 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. ****, $p < 0.0001$) 50

**Şekil 3.9.** Chl-CD kaynaklı Bakır internalizasyonu: Farklı inkübasyon sürelerinde 250 μg/ml Chl-CD ile inkübe edilen hpMKH hücre peletleri aqua regia ile sindirildikten sonra, Bakır varlığı üzerinden Chl-CD internalizasyonu değerlendirilmiştir. Bakır miktarı, ICP-MS ile değerlendirilmiştir. 51

**Şekil 3.10.** Sağlıklı hücre morfolojileri: hpMKH, U251, U87 ve A459 hücrelerinin Ters Mikroskop görüntüleri (Ölçek çizgisi 100 μm). 52

**Şekil 3.11**. Chl-CD' ların hücre canlılığına etkisi: Hücreler 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kabına ekildiken sonra farklı konsantrasyonlarda (500-0 μg/ml) Chl-CD ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı LDH ile değerlendirilmiştir. 53

**Şekil 3.12.** PDT optimizasyonu: A549 hücreleri, 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Chl-CD' lar ile inkübe edildikten 4 saat sonra, farklı dalga boyundaki ışık ile irradiye edilmiştir. Hücre canlılıkları LDH ile değerlendirilmiştir. A. 30 dakika ışık uygulaması B. 1 saat ışık uygulaması. (Gruplar, ışıksız kontrol grubuna göre, 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. **, $p< 0.002$; ***, $p< 0.000$; ****, $p< 0.0001$; ###, $p< 0.0002$). 54

**Şekil 3.13**. Farklı hücre hatlarında PDT yanıtının değerlendirilmesi: A549, U87 ve 4T1 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki Chl-CD ile inkübe edildikten sonra 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. Hücre canlılıkları LDH ile değerlendirilmiştir. 55

**Şekil 3.14**. PDT sonrası hücrelerde apoptoz oluşumu: A549 ve U87 hücre hatları 50 μg/ml Chl-CD inkübasyonundan sonra 1 saat ışık ile irradiye edilmiştir. Apoptotik hücreler, Anneksin boyamasını takiben Akış Sitometrisi' nde analiz edilmiştir. A. A549 B. U87 hücre hattı. 57

**Şekil 3.15.** PDT sonrası ROS oluşumu: U87 hücreleri 50 μg/ml Chl-CD inkübasyonundan sonra 1 saat ışık ile irradiye edilmiştir. ROS boyaması, FITC filtreli floresan mikroskobunda değerlendirilmiştir. A. Sadece Chl-CD uygulanan grup B. Chl-CD uygulaması sonrası ışık ile irradiye edilen grup (Ölçek çizgisi=200 μm). 58

**Şekil 3.16.** PDT uygulamasının hücre döngüsüne etkisi: U87 hücreleri 50 μg/ml CD inkübasyonundan sonra 1 saat ışık ile irradiye edilmiştir. PI boyamasını takiben hücre döngüsündeki tutulmalar Akış Sitometrisi'nde değerlendirilmiştir. 58

**Şekil 3.17.** Total eksozom protein miktarının hesaplanması: Eksozom izolasyonundan sonra protein miktarı BCA ile ölçülmüştür. Absorbans ölçümleri spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. 59

**Şekil 3.18**. Eksozomların morfolojisi: İzole edilen eksozomlar nikel ızgaralara yüklendikten sonra urasil asetat kontrast ajanı ile boyanmıştır. Morfolojik değerlendirmeler TEM' de gerçekleştirilmiştir. 60

**Şekil 3.19.** Eksozom elemental analizi: Eksozomlar, nikel ızgaralara yüklendikten sonra, Chl-CD varlığının tespiti için Bakır sinyal analizi STEM-EDX ile yapılmıştır A. $EXO_{MKH}$, B. $CD@EXO_{MKH}$ . 61

**Şekil 3.20.** Eksozomlardaki Chl-CD' ların kristal yapısı: Chl-CD yüklü eksozomlar (CD@EXO$_{MKH}$), ızgaralara yüklendikten sonra, Chl-CD kristal yapısındaki kafes boşlukları HR-TEM' de görüntülenmiştir. 62

**Şekil 3.21.** Eksozom boyut dağılımı: Eksozomların boyut analizleri NTA ile yapılmıştır. 62

**Şekil 3.22.** Eksozom belirteçlerinin ifadesi: Eksozomlar floresan konjugeli CD63, CD81 ve CD9 antikorları ile boyandıktan sonra ifadeleri Akış Sitometrisi' nde değerlendirilmiştir. PBS kontrol grubu sadece lateks boncuk ve antikorlardan oluşup, eksozom içermemektedir. Yeşil halkalarla belirtilen kırmızı noktalar, pozitifliği göstermektedir. 63

**Şekil 3.23.** Eksozomlarda Chl-CD varlığının tespiti: Fenol Kırmızısı içermeyen besiyerinde hazırlanan serbest Chl-CD, boş eksozom ve Chl-CD içeren eksozomlar, 96 kuyulu kültür kaplarına dağıtılıp, spektrofotometrede absorbans okuması alınmıştır. Chl-CD içeren kuyulardan 400 nm' deki karakteristik pik kaydedilmiştir. 64

**Şekil 3.24.** Chl-CD absorbans kalibrasyon eğrisi: Chl-CD' ların Fenol Kırmızı içermeyen seri dilüsyonları hazırlanmıştır. 96 kuyulu kültür kaplarına 100' er µl dağıtıldıktan sonra, spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı 400 nm absorbans eğrisi oluşturulmuştur. 64

**Şekil 3.25.** Eksozom internalizasyonu: Kanser hücreleri 12 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, eksozomlarla 4 saat inkübe edilmiştir. PBS yıkaması ile internalize olmayan eksozomlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler toplanıp mavi lazer uyarımında kırmızı floresan kaymaları Akış Sitometrisi' nde analiz edilmiştir. 66

**Şekil 3.26.** Eksozom sitotoksisitesi: Kanser hücre hatları 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, farklı konsantrasyonlardaki eksozomlar ile 4 saat inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı LDH ile değerlendirilmiştir. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. *, $p< 0.0332$; **, $p< 0.002$) 67

**Şekil 3.27.** *İn vitro* eksozom aracılı PDT: Kanser hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra 5 µg /ml eksozom ile 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler, 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. Hücre canlılığı LDH ile değerlendirilmiştir. A. A549, B. U251, C. U87. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yol ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. (ns), 0.1234; *, $p< 0.0332$; ***, $p< 0.0002$; ****, $p< 0.0001$ ). 69

**Şekil 3.28.** Eksozom aracılı PDT sonrası hücre morfolojileri: 5 µg/ml eksozom uygulanan hücreler 4 saatlik inkübasyon sonunda PBS ile yıkanıp, taze besiyerinde 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. PDT uygulamasının hemen ardından hücre görüntüleri ters mikroskopta çekilmiştir. A. A549, B. U251, C. U87 hücre hatları (ölçek çizgisi=200 µm). 71

**Şekil 3.29.** Serbest Chl-CD biyodağılımı: 250 ve 500 µg/ml Chl-CD, Balb/c farelerin kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra Chl-CD' ların intrinsik floresanı IVIS' de görüntülenmiştir. 73

**Şekil 3.30.** Eksozom biyodağılımı: 40 µg/ml $EXO_{MKH}$ ve $CD@EXO_{MKH}$ Balb/c nude farelere kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra, organlarındaki eksozom biyodağılımı IVIS' de değerlendirilmiştir. 74
**Şekil 3.31.** Serbest Chl-CD aracılı PDT sonrası tümör hacimleri: U87 inokülasyonu ile oluşturulan tümör modelinde 250 µg/ml Chl-CD intratümöral olarak enjekte edilip, ardından tümör bölgesi 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. İşlem 3' er gün arayla tekrarlanmıştır. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. (ns), 0.1234; ****, p< 0.0001 ). 75
**Şekil 3.32.** Eksozom aracılı PDT sonrası tümör hacimleri: U87 inokülasyonu ile oluşturulan tümör modelinde 40 µg/ml eksozom intravenöz olarak enjekte edilip 24 saat sonra, tümör bölgesi 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. (ns), 0.1234; ***, p< 0.0002; ****, p< 0.0001). 76
**Şekil 3.33.** Serbest Chl-CD aracılı PDT sonrası organ histolojileri (ölçek çizgisi = 50µm). 77
**Şekil 3.34**. Chl-CD aracılı PDT sonrası tümör doku histolojileri (ölçek çizgisi=2 mm). 77
**Şekil 3.35.** Eksozom aracılı PDT sonrası organ histolojileri (ölçek çizgisi= 50 µm). 78
**Şekil 3.36**. Eksozom aracılı PDT sonrası tümör doku histolojileri. 78
**Şekil 4. 1.** Karbon Dot' ların kristalin yapısında yer alan kafes boşlukları. 81
**Şekil 4.2**. Görünür ışık spektrumları. 83

# ÇİZELGELER

**Çizelge 1.1.** Eksozomların, rejeneratif amaçla kullanıldığı örnek çalışmalar 7
**Çizelge 1.2.** Eksozomların, hastalık belirteci olarak kullanıldığı örnek çalışmalar. 8
**Çizelge 1.3.** Eksozomların, taşıyıcı ajan olarak kullanıldığı örnek çalışmalar. 9
**Çizelge 1.4**. Eksozom yükleme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları 10
**Çizelge 1.5.** MKH kaynaklı eksozomların, kanser çalışmalarında kullanıldığı örnek çalışmalar. 12
**Çizelge 1.6.** Eksozom aracılı PDT yaklaşımlarına örnek çalışmalar. 22
**Çizelge 2.1.** İn vivo deney grupları. 42

# 1. GİRİŞ

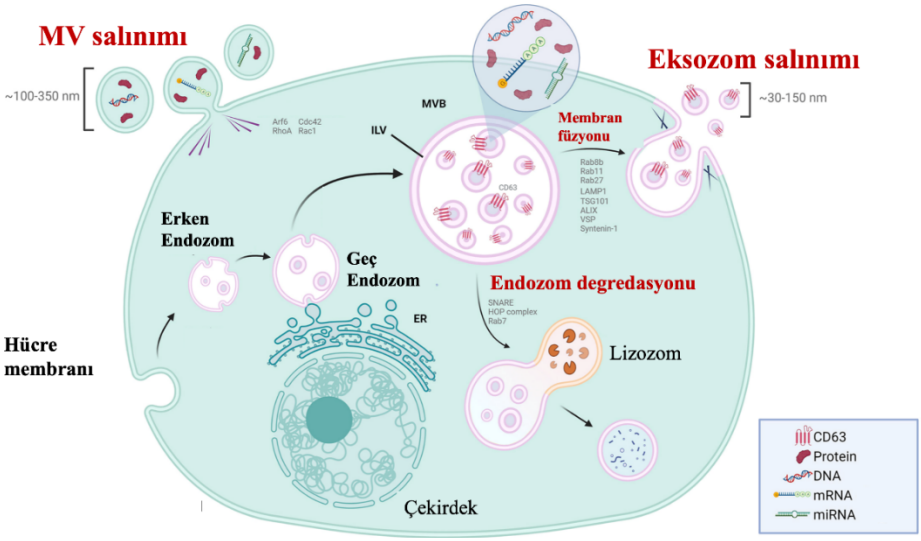
## 1.1.Eksozomlar

### 1.1.1.Eksozom Biyosentezi ve İçeriği

Hücreler, hücrelerarası iletişimi sağlamak için, farklı içerik ve boyutlarda Ekstraselüler Veziküller (EV) salgılar. Protein, yağ, nükleik asit gibi hücresel içeriklerle dolu ve lipid membran ile kaplı bu kesecikler; apoptotik cisimcikler (500-5000 nm), mikroveziküller (100-1000 nm) ve eksozomlar (30-150 nm) olarak üç farklı alt tipte kategorize edilir. Her üç vezikül tipi de mevcut fizyolojik ve patolojik durumda belirteç niteliğinde olmakla beraber aynı zamanda tedavi yaklaşımları için de potansiyel birer hedeftir (Wen vd., 2023). Salgılanmış olduğu parental hücreyi temsil eden bu veziküller, çevre ve hedef hücrelere internalize olurlar. Vezikül içindeki hücresel bileşenler alıcı hücre sitoplazmasına bırakılır ve böylece hücresel mekanizmalara, moleküler düzeyde dahil olurlar.

EV' leri birbirinden ayıran en temel nokta biyosentez süreçlerinin farklı olmasıdır. Bununla bağlantılı olarak vezikül bileşenleri, hedef hücreleri ve ilettiği mesaj değişir. Örneğin; Apoptotik Cisimcik (AB) apoptoz sürecine giren hücreler tarafından salgılanır. Hücre membranının yüzeyinden kabarcıklanmalar şeklinde oluşur. Bazı organel artıkların, apoptotik belirteçlerin de yer aldığı proteinlerce zengin bir içeriğe sahiptir, ve hedef hücreleri çoğunlukla fagositlerdir (Sheta vd., 2023). Mikroveziküller (MV) ise, eksozomlar ile benzer içeriklere ve fonksiyonlara sahip olsalar da eksozomlardan farklı olarak, hücre membranının ekstraselüler boşluğa doğru tomurcuklanması şeklinde oluşur. Bu sebeple sitoplazma ve plazma membranıyla ilişkili proteinlerden zengin bir içeriğe sahiptir (Drobiova vd., 2023).

Eksozom biyosentezi; diğer EV' lerden farklı olarak endozomal yolak aksında gerçekleşir. Hücre membranının sitozole doğru invaginasyonu ile hücre içinde erken endozom vezikülleri oluşur. Endozom membranı da kendi iç lümenine doğru oyuklanmalar yaparak İntralüminal Vezikülleri (ILV) oluşturur. ILV' ler ile dolu olan bu endozom Multiveziküler Cisim (MVB) adı verilen geç endozomlara olgunlaşır (Şekil 1.1.). İçinde eksozomların yer aldığı MVB' ler hücre membranı ile füzyonu uğradığında, eksozomlar hücre dışına salınır ya da diğer ihtimalle lizozomlar tarafından degrede edilir (Krylova & Feng, 2023).



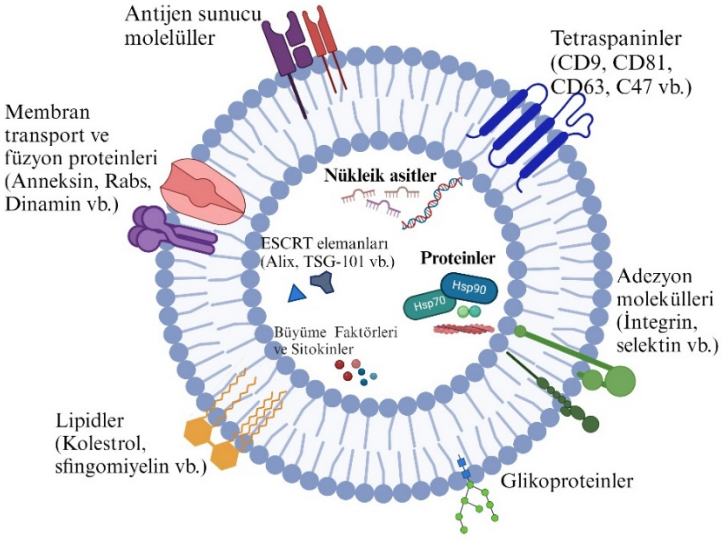

**Şekil 1.1.** Eksozom biyosentez aşamaları. Rojas vd. (2024) yayınından uyarlanmıştır (Rojas & Regev-Rudzki, 2024).

Eksozomlar ekstraselüler alana salındıktan sonra biyodağılım süreçleri başlar ve hedef hücre başta olmak üzere, çevre hücrelere doğru göç ederler. Alıcı hücre ile temas eden eksozomlar hücre membranındaki reseptörüne bağlanarak, hücre membranı ile füzyon oluşturarak ya da endositoz aracılığı ile hücre içine alınabilir. Her üç durumda da eksozomların hedef hücrede fonksiyonel olarak aktif olabilmesi için içeriğini hedef hücre sitoplazmasına bırakması gerekmektedir. Şayet, eksozom içeriği hedef hücrenin endozom yolağına dahil edilirse ya lizozomlar tarafından degrede edilir ya da ekstraselüler boşluğa salınabilir. Bu sebeple eksozomların ya da eksozomal içeriğin hedef hücrede fonksiyonel olarak aktif olabilmesi için "endozomal kaçış" sağlaması gerekmektedir (O'Brien vd., 2022).

Eksozom üretiminden salınımına kadar geçen süreçte moleküler yolaklar ve bir seri proteinler görev alır. ALIX, TSG01' in dahil olduğu ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) protein ailesi eksozomları oluşturacak olan ILV oluşumu ve içeriğindeki kargo çeşitliliğini organize eder (L. Zhao vd., 2020). Tetraspinler (CD63, CD9, CD81 vb.) eksozom biyosentezinde, kargo seçiciliğinde, eksozomların hedef hücre belirlemesinde ve hücresel internalizasyonunda, ısı şoku proteinleri (Hsp90, Hsp70 vs.) ise eksozom salınımında görev alırlar. Rab, SNAP ve SNARE protein türleri eksozomlar içine kargo yüklenmesi, farklı kompartımanlara taşınması ve eksozom salınımını regüle ederler. Sürece dahil olan moleküller, hücreden hücreye fark etmeksizin eksozom sentez aşamalarında görev aldıkları için tüm eksozomların ortak belirteçleridir (Gurung vd., 2021). Ancak;

eksozom içeriğindeki kargo bileşenleri ve yüzey molekülleri eksozomu salgılayan hücrelere spesifiktir ve eksozom kaynağına göre değişkenlik gösterebilir. Bu sebeple eksozomlar, köken aldığı hücrenin doğasını yansıtırlar.

Eksozomlar, zengin protein içeriklerinin yanı sıra, sfingomiyelin, kolesterol ve seramid gibi kargo seçilimi, eksozom salınımı ve sinyalizasyonunda görev alan lipid bileşenleri ve yoğun miktarlarda nükleik asit kompleksleri içerir (Şekil 1.2.). Eksozomların 4400' den fazla protein, yaklaşık 200 farklı lipid, 1600'den fazla mRNA ve 750'den fazla miRNA içerdiği bilinmektedir (Mathivanan vd., 2011). Eksozom kargosunun yüklenmesinde, yüklenecek olan bileşenler için seçici bir mekanizma işlemektedir. Eksozom kargosunda yer alan RNA türleri için hnRNPs (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) ve SYNCRIP (Synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA- interacting protein) gibi RNA bağlama proteinlerinin aktif olarak görev aldığı bilinmektedir (Y. Chen vd., 2021),(X. Zhou vd., 2023). Eksozomal içeriklerin spesifik olarak tanınması ve yüklenmesinde ubikitinasyon ve sumolasyon gibi post-translasyonel modifikasyonların etkili olduğu belirtilmektedir (Villarroya-Beltrí vd., 2013). İşaretlenmiş proteinler ve belirlenmiş motif dizilimleri, spesifik seçilimlerle eksozomal yüklemelerin gerçekleşmesini sağlar. Patolojik durumlardaki eksozomal içerik değişiklikleri ve yükleme mekanizmaları ise hala sıcak araştırma konuları arasındadır (Shukla vd., 2023).




**Şekil 1.2.** Eksozom bileşenleri (BioRender ile oluşturulmuştur).

### 1.1.2.Eksozomların Hedef Belirleme ve İnternalizasyon Mekanizmaları

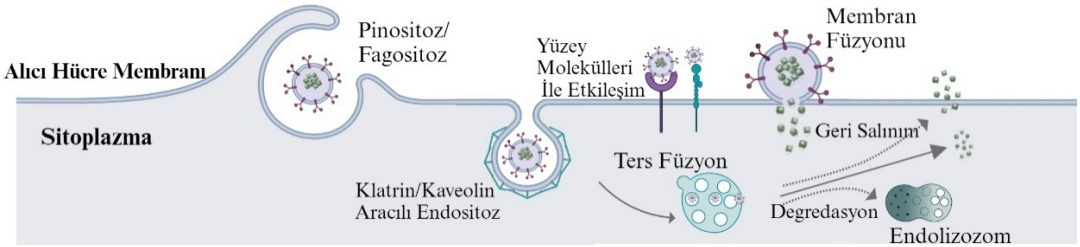
Eksozomlar uygulama yolu (intravenöz, intratümöral vb.), kargo içeriği ve yüzey bileşenlerine bağlı olarak farklı biyodağılım davranışı sergileyebilir. Eksozomların hedef belirleme yetenekleri aktif ve pasif mekanizmalar olarak kategorize edilebilir.

Pasif hedefleme; eksozomun intrinsik olarak sahip olduğu yüzey moleküllerinin, alıcı hücre reseptörleri ile arasındaki spesifik iletişiminden kaynaklanan bir mekanizmadır. Hoshino ve ark. göğüs kanseri kaynaklı, integrin-αvβ5 ifade eden eksozomların karaciğer Kupffer hücrelerine afinite gösterdiklerini, integrin-α6β4 ifadesi fazla olan eksozomların ise akciğer fibroblast ve epitel hücrelerine bağlanarak organ spesifik tropizm sergilediklerini göstermiştir (Hoshino vd., 2015). Eksozom membranında yer alan tetraspinler (CD63, CD47 vb.), lipidler (fosfatidiletanolamin, sfingomiyelin vb.) ve donör hücre kaynaklı tanıma molekülleri de doğal hedef belirleme mekanizmasında rol alan diğer faktörlerdir (Toda vd., 2015), (Sancho-Albero, Navascués, vd., 2019). Pasif hedeflemenin kontrolü, eksozomun kaynak aldığı öncül hücrededir.

Aktif hedefleme ise; eksozomların hedefleme kapasitesini arttırmak veya istenilen bir kargoyu alıcı hücreye taşımak için geliştirilen mühendislik yaklaşımlarıdır. Eksozomların biyodağılımı, belirli hücrelere yönelik hedefleme ve terapötik kullanımı, yüzey özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle istenen özellikler yüzey mühendisliği teknikleri kullanılarak elde edilebilir. EGFR hedefleyen peptidlerin eksozom membranına konjugasyonu ile, eksozomların EGFR pozitif akciğer kanser hücrelerini hedefleme kapasiteleri ve hücresel internalizasyonları arttırılabilir (Pham vd., 2021). Aynı zamanda kaynak hücrede gerçekleştirilecek genetik modifikasyonlarla da eksozom içeriğini ve yüzey özelliklerini değiştirmek mümkündür. Tsai ve ark. Tarafından gerçekleştirilen çalışmada; viral transfeksiyon yardımı ile hücrelerin FGL1 ve PD-L1 ifade etmeleri uyarılmıştır. Bu hücrelerden salgılanan eksozomların membran yüzeylerinde de aynı şekilde FGL1 ve PD-L1 çift ifadenin sergilendiği gösterilmiştir. Genetik olarak modifiye edilen eksozomların, T hücresindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak kalp transplantasyonu yapılan farelerde T hücre aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Tsai vd., 2021).

Hedef hücreye ulaşan eksozomlar birden fazla yol üzerinden alıcı hücreye internalize olmaktadır (Şekil 1. 3.). Eksozom, SNARE ve Rab proteinleri aracılığıyla, alıcı hücre membranı ile füzyona girdiğinde eksozomal içerik direkt olarak hücre sitoplazmasına aktarılır. Bu sebeple füzyon; kargonun aktif olarak hücre mekanizmalarına dahil olmasını sağlayan en efektif yolaktır (Krylova & Feng, 2023). Dendritik hücrelerden salgılanan eksozomlar, hedef tümör hücresindeki TNF (Tümör Nekrozis Faktör) reseptörüne bağlanarak, hücre içine alınmadan da, hücresel sinyalizasyonları indükleyebilir (Munich vd., 2012). Ancak eksozomların alıcı hücre tarafından hücre içine alınmasında kullanılan ana yolağın endositoz olduğu belirtilmektedir.

Klatrin/Kaveolin-aracılı endositozda; eksozomlar alıcı hücre membranına tutunduktan sonra hücre membranı sitoplazmaya doğru çukurlaşır. Klatrin/Kaveolin kaplı eksozom yüklü bu invaginasyon vezikülleri Dynamin-2 yardımı ile hücre membranından kopar ve intraselüler ilerleyiş başlar (Gonda vd., 2020). Fagositoz, makro/mikropinositoz ve lipid raft aracılı endositoz yolaklarının da eksozom internalizasyonunda rol aldığı bilinmektedir. İnternalizasyon yolağı, alıcı hücre tipine ve eksozom içeriğine göre değişkenlik göstermekle birlikte her üç sistemin aynı anda devrede olabildiği belirtilmektedir (Lau & Yam, 2023).




**Şekil 1.3.** Eksozomların alıcı hücre tarafından hücreye alınma yolları

Eksozomal kargo endositoz yolağı ile hücre içine alındıktan sonra, oluşan erken endozom vezikülü olgunlaşmaya başlar. Bu noktadan sonra geç endozom içindeki eksozomlar ya lizozom füzyonu ile degredasyona uğrar ya da tekrar hücre membranı ile füzyona girerek hücre dışına salgılanır. Ancak eksozomal kargonun alıcı hücrede fonksiyonel olarak aktif olabilmesi için seçebileceği bir diğer seçenek de endozomal sindirimden kaçıştır. Bu durumda, alıcı hücreye taşınan moleküller degredasyona uğramadan hüre sitoplazmasına dağılır. Bu sistem henüz tam olarak anlaşılamayan, ancak eksozomal içeriğin intralüminal salınımı için birincil öneme sahip bir süreçtir (Niel vd., 2018). Eksozomlar endositoz yolu ile hücre içine alındıktan sonra, geç endozom evresine geçmeden önce, endozomlar ve lizozomlar füzyona girerek endolizozom adı verilen hibrit bir organel oluşturur. Eksozom internalizasyonunun bu

organel oluşumunu tetiklediği ve çoğu eksozomun bu organel içinde birikim gösterdiği gözlenmiştir. Önerilen hipotezlerden birine göre; eksozomların dirençli lipid içeriğinden dolayı düşük pH'a karşı dirençli olduğu ve lizozomal degredasyonun uzun sürdüğü düşünülmektedir. Bu süre zarfında lizozomal aktivitenin, endozomal zarlarda geçici olarak geçirgenliğe sebep olabileceğine ve eksozomal içeriğin sitoplazmaya doğru sızabileceğine inanılmaktadır (Polanco vd., 2021). Diğer bir bakış açısı da eksozom internalizasyonunun ve membran füzyonunun rastgele olabileceği ya da füzyojenik proteinlerin varlığına bağlı olarak kontrol edilebileceği yönündedir. Eksozomların endozom membranına füzyonu ile endozomal permebilizasyondan bağımsız olarak da eksozomal içeriğin sitoplazmaya salınabileceği savunulmaktadır (Ribovski vd., 2023).

### 1.1.3. Eksozomların Kullanım Alanları

Eksozomların kullanım alanlarını tanı, tedavi ve ilaç taşıyıcı ajanlar olarak üç temel başlık altında toplamak mümkündür. İlk olarak eksozomlar; canlı organizma sistemlerindeki stabilitesi, düşük toksisitesi ve zengin biyomoleküler içeriği ile dejeneratif hastalıkların tedavisi, hastalık seyrinin modüle edilebilmesi ve/veya doku rejenerasyonu için umut vericidir. Kas-iskelet sistemi (X. Cao vd., 2024), nörolojik hastalıklar (Abedi vd., 2022), bağışıklık sistemi rahatsızlıkları (Weijiang Liu vd., 2021), kardiyovasküler bozukluklar (Shafei vd., 2022) ve göz hastalıkları (Shafei vd., 2022) gibi geniş bir spektrumu kapsayan çalışma alanına sahiptir (Çizelge 1.1.). Kök hücre uygulamalarını sınırlayan toksisite, immünojenite, tümörijenik potansiyel ve etik engellere kıyasla eksozomlar daha güvenli ve çok yönlü bir alternatif olarak değerlendirilmektedir (Tan vd., 2024).

**Çizelge 1.1.** Eksozomların, rejeneratif amaçla kullanıldığı örnek çalışmalar

| Hedef Hastalık | Eksozom Kaynağı | Aktif Kargo | Potansiyel Rejeneratif Yol | Referans |
|---|---|---|---|---|
| Sinir Hastalıkları | Endotel hücreler | miRNA-199-5p | PI3K/AKT/PTEN aksı üzerinden Schwann hücre fenotipinin güçlendirilmesi | (Huang vd., 2023) |
| Kardiyovasküler | UPKH | miRNA22 | Kardiojenik farklılaşma | (Kurtzwald-Josefson vd., 2020) |
| Karaciğer | Koryonik MKH | MicroRNA-125b | Karaciğer rejenerasyonu | (Hyun vd., 2015) |
| Kemik-kıkırdak | MKH | miRNA-140-5p | Kondrojenik farklılaşma | (Y. G. Kim vd., 2020) |
| Diyabet | UK-MKH | miR-450-b-5p, miR-let-7a-5p, miR-24-3p | pankreasta Extl3-REg yolağının regülasyonu | (R. Sharma vd., 2021) |
| Kemik-kıkırdak | Kondroprogenitör hücreler | | Progenitör hücre farklılaşması | (Lin vd., 2020) |
| Göz Hastalıkları | Ki-MKH | Argonaute-2 | Retinal ganglion hücre rejenerasyonu | (Mead & Tomarev, 2017) |
| Kas Yaralanması | Miyoblastlar | Büyüme faktörleri | Uydu hücrelerinin çoğalması, kas rejenerasyonu, iskelet kası atrofisi | (Ji vd., 2022) |
| Cilt lezyonu | UK-MKH | PF-127 hidrojel | Cilt granülasyonunu uyararak yara iyileşmesinin hızlanması | (J. Yang vd., 2020) |

Eksozomlar kaynak aldıkalrı hücrelerin metabolik durumunu yansıtan içeriklere sahip oldukları için, eksozomların bir diğer potansiyel kullanım alanı hastalık tanı veya teşhisindir (H. Wei vd., 2021). Eksozomlar, farklı hücre tipleri tarafından salgılanırlar ve tüm biyolojik sıvılarda bulunurlar. Hastalardan toplanan kan, idrar veya beyin omurilik sıvısından izole edilen eksozomların içerikleri, hastalık belirteci olarak değerlendirilebilir. Örneğin; Multiple Sklerozis (MS) otoimmün hastalığı ile örtüştürülen Treg hücre disfonksiyonunun eksozomlar aracılığı ile taşınan miR-let7'i lerin sebep olduğu ve potansiyel bir tedavi hedefi olabileceği belirtilmiştir (Kimura vd., 2018). Aynı zamanda, eksozomal miRNA profilinde ifade değişikliği gösteren miR-15b-5p, miR-23a-3p, miR-223-3p gibi nükleik asitlerin, MS hastalığının aşamalarının değerlendirilmesi ve hastalığın alt tiplerinin tanımlanması için potansiyel biyobelirteçler olabileceği düşünülmektedir (Ebrahimkhani vd., 2017). Aynı şekilde, Oral Skuamöz Hücreli Karsinom (OSCC) hastalarının tükürüklerinden izole edilen eksozomal protein panellerinde belirlenen üç spesifik proteinin, hastalığın erken teşhisi için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Bozyk vd., 2023) (Çizelge 1.2.) .

**Çizelge 1.2.** Eksozomların, hastalık belirteci olarak kullanıldığı örnek çalışmalar.

| Hastalık | Eksozom kaynağı | Belirteç | Referans |
|---|---|---|---|
| Alzheimer Hastalığı | Beyin doku | pS396 tau, Aβ1–42 | (Muraoka vd., 2020) |
| Koroner Alter Baypas Greftleme | İdrar | 4-aminohippürik asit<br>sitrik asit, N-1-metilnikotinamid | (Agudiez vd., 2020) |
| Akut Koroner Sendrom | Serum | miR-146a | (L. J. Li vd., 2021) |
| Endometriozis | Serum | miR-26b-5p, miR-215-5p, miR-6795-3p | (Yahong Wu vd., 2022) |
| Kolorektal Kanser | Serum | miR- 221/222, circ_FMN2 | (Tian vd., 2021), (Q. Yu vd., 2024) |
| | | miR-let7 | (Kimura vd., 2018) |
| Romatoid Artrit | Serum | lncRNA, TCONS_I2_00013502, ENST00000363624 | (H. Wu vd., 2024) |
| Tüberküloz | Plazma | miRNA-185-5p | (Kaushik vd., 2021) |

Kan Beyin Bariyeri (KBB) gibi biyolojik bariyerleri geçebilme yetenekleri, dolaşımdaki yüksek stabiliteleri ve hedef belirleme kapasiteleri ile, tanı ve tedavi uygulamalarının yanı sıra, eksozomlar ilaç taşıma sistemlerinde de heyecan verici birer adaydır (C. Li vd., 2022). Özellikle sistemik dolaşıma uygulanan ilaçlar istenmeyen biyodağılım ve yan etkilerin neden olduğu sınırlamalarla karşılaşılmaktadır. Hedef bölgeye ulaşan terapötik ajan miktarını arttırabilmek için uygulama dozunu yükseltmek, ilaca dirençli hücre popülasyonlarının genişlemesi, tümörojenik olmayan hücrelerde apoptozun uyarılması ve hedef dışı toksisite gibi olumsuz sonuçlar doğurabilir. Bu nedenle hedef belirleme kapasitesi yüksek, biyo-uyumlu, immünouyumlu ve istenmeyen yan etki riski düşük taşıyıcı sistemlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Küçük moleküller, nükleik asitler ve terapötik moleküllerin lokal konsantrasyonunu arttırmak ve istenmeyen yan etkileri azaltmak için eksozomlar; ilaç taşıma sistemlerinde yüksek standartlarda taşıyıcılar olarak önerilmektedir (Kar vd., 2023).

Tanı, tedavi ya da görüntüleme amacı ile biyolojik sistemlere dahil edilen teranostik ajanların daha efektif ve güvenli şekilde hedef bölgeye ulaşabilmeleri için taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle suda çözünürlükleri az, biyolojik ömrü kısa ve hedef dışı toksisiteleri yüksek moleküller için, eksozomlar potansiyel birer ilaç taşıma aracı haline gelmiştir (Çizelge 1.3.). İfade ettikleri CD47 molekülü sayesinde, taşıdıkları aktif moleküllerin immün hücreler tarafından fagosite edilmesini engeller ve aynı zamanda degradasyon riskini azaltırlar (Sadeghi vd., 2023).

Lipozomlar gibi ilaç taşıma sistemleri ile karşılaştırıldığında, eksozomlar; güçlü biyouyumluluğa, düşük hedef dışı sitotoksisiteye, düşük immunojeniteye ve yüksek hedefleme kapasitesine sahiptir (Pullan vd., 2019). Kim ve ark., yapmış oldukları çalışmada; eksozomların, lipozomlara kıyasla kanser hücresinde daha fazla akümüle olduğunu ve serbest malzemeyle karşılaştırıldığında 30 kat daha fazla internalizasyon gösterdiğini iddia etmişlerdir. Bu sonucun; eksozomların kanser hücresindeki Pgp aracılı direnç mekanizmasını baypas etme yeteneğinden kaynaklanabileceği vurgulanmıştır (M. S. Kim vd., 2016). Değirmenci ve ark.' nın çalışmasında ise; lapatinib yüklü eksozomlar, serbest lapatinib uygulamasına kıyasla daha düşük dozda daha yüksek efektiflikte anti-kanser yanıt alabilmeyi sağlamıştır. Yapılan gen ekspresyon değerlendirmelerine göre; eksozomlar aracılığı ile taşınan ilacın etki mekanizmasının değişmediği, aynı yolaklar üzerinden etkinliğini sürdürdüğü gözlenmiştir (Değirmenci vd., 2022).

**Çizelge 1.3.** Eksozomların, taşıyıcı ajan olarak kullanıldığı örnek çalışmalar.

| **Eksozom Kaynağı** | **Kargo** | **Yükleme Metodu** | **Hedef** | **Uygulama** | **Referans** |
|---|---|---|---|---|---|
| PC 3 | AuNP, 13 nm | Hücre inkübasyonu | PC3 | Nükleik asit taşıma | (Alhasan vd., 2014) |
| B16F10 | SPIONs, 5nm | Eksozom inkübasyonu ve elektroporasyon | Lenf Nodül | MRI Görüntüleme | (Hood vd., 2014) |
| MKH | Venofer, 65 nm | Hücre inkübasyonu | PC3, Hela | Manyetik hipotermi | (Altanerova vd., 2017) |
| Raw 264 | SPIONs, 5nm + curcumin | Elektroporasyon | U251 | Görüntüleme ve terapi | (Jia vd., 2018) |
| B16F10 | AuNp, 13 nm | Hücre inkübasyonu | B16F10 | Görüntüleme | (Lara vd., 2020) |
| MKH | Porfirin | Elektroporasyon Saponin aracılı Pasif İnkübasyon | MDA | PDT | (Fuhrmann vd., 2015) |
| HEK293 | HchrR6 mRNA | Transfeksiyon | HER2+ BT474 | Terapi | (Forterre vd., 2020) |
| Serum | Dox/miR-21i | Ko-inkübasyon | U87, MDA-MB-231 | Terapi | (Zhan vd., 2020) |
| MKH | LNA-antimiR-142-3p | Elektroporasyon | MCF-7 | Terapi | (naseri vd., 2020) |
| İnek Sütü | İnsülin | Sonikasyon | | Oral Terapi | (L. Wu vd., 2022) |

Tanı veya tedavi amaçlı kullanılacak olan moleküller eksternal ve internal olmak üzere iki farklı yöntemle eksozomlara yüklenebilir (Çizelge 1.4.). Eksternal yüklemede; izole edilen boş eksozomların kargo molekülü ile etkileşimi sonucu yükleme gerçekleştirilebilir. İnternal yüklemede ise; kargo molekülü direkt olarak eksozom kaynağı olan hücre ile inkübe edilir. Molekül, hücre internalizasyonunu gerçekleştirdikten sonra eksozom biyosentez yolağına

dahil olarak, eksozomlara hücrenin kendisi tarafından yüklenebilir. Eksozomlar, halihazırda kargo ile yüklenmiş olarak hücrelerden salgılanır (Zeng vd., 2023).

**Çizelge 1.4**. Eksozom yükleme yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

| YÖNTEM | AVANTAJLARI | DEZAVANTAJLARI |
|---|---|---|
| **Eksternal yükleme** | | |
| Eksozom ile inkübasyon | Basit bir yöntemdir.<br>Ulaşılması zor ekipmanlara ihtiyacı yoktur.<br>Eksozom membran bütünlüğü korunur.<br>Daha çok küçük lipofilik moleküller için uygundur<br>Toksisite riski yoktur | Eksozom agregasyonuna sebep olabilir.<br>Fazla malzemenin uzaklaştırılması için pürifikasyon basamakları gereklidir.<br>Yüzeye bağlanma ve hedef belirlemede aktif olan ligandların bloklanma riski olabilir.<br>Düşük oranda yüklenme kapasitesi ve tekrarlanabilirliğe sahiptir. |
| Elektroporasyon | Yüksek yükleme kapasitesine sahiptir.<br>Ekstra bir kimyasala ihtiyaç duymaz.<br>miRNA, siRNA ve hidrofilik malzemeler için uygundur. | Eksozom membran bütünlüğü bozulabilir.<br>Yüklenecek molekül, eksozoma ait biyomeleküllerle füzyona girebilir.<br>Malzemenin agregasyonuna ve stabilitesinin bozulmasına sebep olabilir. |
| Sonikasyon | Yüksek yükleme kapasitesine sahiptir.<br>Az miktarda malzeme kullanımı sağlar. | Eksozom membran bütünlüğü bozulabilir.<br>Eksozom viskozitesi değişebilir.<br>Yükleme sonrası eksozom pürifikasyonu gereklidir. |
| Dondur çöz | Basit bir yöntemdir.<br>Ulaşılması zor ekipmanlara ihtiyacı yoktur. | Düşük yükleme kapasitesine sahiptir.<br>Tekrarlanan döngüler protein inaktivasyonuna sebep olabilir.<br>Yüksek ölçekli üretime uygun değildir. |
| Deterjan aracılı yükleme | Kısa sürede yüksek yükleme kapasitesi sağlar. | Toksik kontaminantlara sebep olur.<br>Ekstra pürifikasyon basamağı gereklidir.<br>Membran bütünlüğünde bozulmaya sebep olur. |
| **İnternal yükleme** | | |
| Parental Hücre İnkübasyonu | Eksozom membran bütünlüğünün korunur.<br>Ekstra pürifikasyon gerektirmez.<br>Çoğunlukla eksozom yüzeyine bağlanma değil içine yükleme sağlanır.<br>Eksozom agregasyonuna sebep olmaz. | Parental hücre toksisitesi ve farklılaşma riski olabilir.<br>Eksozom içeriğinin değişmesine sebep olabilir.<br>Standardizasyonu, kontrol edilebilirliği ve tekrarlanabilirliği zordur.<br>Fazla malzeme tüketimi gerektirir. |

### 1.1.4. Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ve Kanser Uygulamaları

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)' ler; Tümör Mikroçevresini (TME) yeniden modelleyebilme ve bağışıklık sistemi elemanlarını manipüle edebilme kapasiteleriyle kanserin ilerleme seyrini değiştirebilir (Padinharayil vd., 2024). Tümörde lokalize olduktan sonra, tümör büyümesini baskılayarak ve apoptozu teşvik ederek anti-tümör aktiviteler sergileyebilir (F. Zhang vd., 2022). Diğer yandan, MKH' ler tümör hücreleri tarafından eğitilerek kendi ihtiyaçları doğrultusunda yönlendirilebilir. Eğitilmiş MKH' ler tarafından salgılanan sitokinler tümör büyümesi, ilaç direnci geliştirme, anjiyogenez ve metastaz gibi kanserin ilerlemesinde etkili adımlarda tümör hücrelerine hizmet etmeye başlayabilir (Shi vd., 2016). Bu kapsamda yapılan çalışmalarda, MKH' lerin köken aldıkları dokulara göre tümör uyarıcı ya da baskılayıcı özelliklerinin değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (Liang vd., 2021). Örneğin; Kemik İliği kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (Kİ-MKH) ve Adipoz Doku kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (AD-MKH) ile yapılan çalışmaların, sırasıyla % 26' sı ve % 46' sının kanser baskılayıcı etkiye sahip olduğu, Umblikal Kord kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde (UK-MKH) ise bu oran % 88' e çıktığı belirtilmiştir (Christodoulou vd., 2018).

MKH' ler, anlamlı derecede tümör mikroçevresini hedefleme ve o bölgeye göç edebilme kapasitesine sahiptir. MKH' lerin bu davranışının altında farklı mekanizmalar yatar. Bunların başında SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor-1), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IL-6, IL-8, CCL21 gibi sitokinler ve onların MKH' lerde ifadelenen reseptörleri ile olan etkileşimleri gelir. Bu uyarıcıların varlığı MKH göçünde, tümör dokuya penetrasyonunda ve yerleşmesinde aktif rol alır (T. Zhang vd., 2022). Bunların dışında membranlarındaki yüzey adezyon molekülleri, tümör mikro çevresindeki ekstraselüler matriks bileşenleri, tümör dokunun inflamatuar çevresi ve MKH' lerin immünmodülatör özellikleri gibi birçok farklı faktör bu davranış şeklinde rol oynar (Hass vd., 2020). Ancak; MKH' lerin *in vivo* ortamda kontrolsüz davranışı klinik uygulamalar için bazı engellemeler doğurmaktadır. Özellikle; istenmeyen farklılaşma olasılıkları, hedef dışı biyodağılım göstermeleri, tümörojenite ve tekrarlı uygulamalarda toksik etki yaratma riski, araştırmacıları hücresel tedavilere alternatif yöntem arayışına sürüklemiştir (Moghadasi vd., 2021).

Eksozomlar, salgılanmış oldukları MKH' ler ile benzer karakterler sergiler. Tıpkı MKH' ler gibi tümör mikroçevresini hedefleyebilir, tümör dokuda birikim gösterirler ve alıcı hücrelerde hücre mekanizmalarını modüle edebilirler (R. Zhao vd., 2020). Kök hücre bazlı tedavi yaklaşımlarına kıyasla, hücresel kaynaklı bir ürün olan eksozomların kontrolsüz çoğalma ya da farklılaşma ihtimalleri olmadığı için daha güvenli olacağı düşünülmektedir

(Adamiak vd., 2018). Tıpkı MKH' ler gibi Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ($EXO_{MKH}$)' nın da kanser gelişimindeki etkileri tartışmalıdır (Al-Awsi vd., 2023), (Taheri vd., 2024). Bunun yanı sıra; MKH eksozomlarının dolaşım sistemindeki uzun yarı ömürleri, yüksek stabiliteleri, ekstraselüler matriks ve hücresel direnç mekanizmaları gibi engelleri aşma yetenekleri ile etkili birer taşıyıcı oldukları kabul edilmektedir (L. Li vd., 2020), (Kar vd., 2023). Derin doku penetrasyonları, düşük immünojeniteleri, biyolojik bariyerleri kolaylıkla geçebilme yetenekleri, yüksek tümör hedefleme kapasiteleri ve daha bir çok eşsiz özelliklerinden dolayı; $EXO_{MKH}$' ları terapi, görüntüleme ve ilaç taşıma gibi bir çok kanser çalışmasında kullanılmaktadır (Padinharayil vd., 2024). Çizelge 1.5.' de farklı MKH kaynaklı eksozomlarla yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

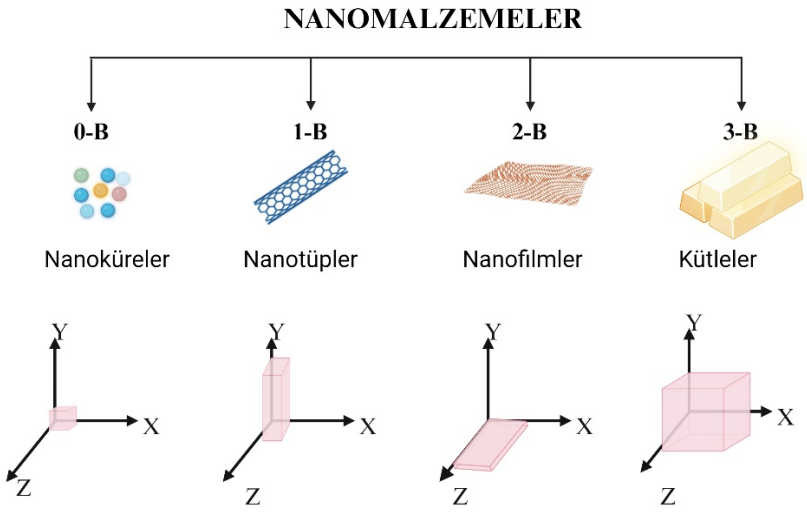
**Çizelge 1.5.** MKH kaynaklı eksozomların, kanser çalışmalarında kullanıldığı örnek çalışmalar.

| **Kaynak** | **Kullanım Amacı** | **Ajan** | **Hedef Hücre** | **Etki** | **Ref.** |
|---|---|---|---|---|---|
| UK-MKH | Taşıyıcı | lncRNAPTENP1 | U87 | miR-10a-5p/PTEN yolağını regüle ederek yüksek anti-tümörojenik etki. | (Hao vd., 2019) |
| UK-MKH | Taşıyıcı | miR-145–5p | PDAC | Smad3 aşağı regülasyonu ile proliferasyon inhibisyonu | (Ding vd., 2019) |
| UK-MKH | Taşıyıcı | miRNA-128–3p | PANC-1 | Proliferasyon, invazyon ve migrasyon inhibisyonu. | (X. Xie vd., 2022) |
| UK-MKH | Görüntüleme | gadolinyum | Osteosarkoma | MRI biyo-görüntüleme ajanı olarak kullanılabilir. | (Abello vd., 2019) |
| Kİ-MKH | Taşıyıcı | miR-101–3p | TCA8113 | Tümör proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonunun inhibisyonu | (C. Xie vd., 2019) |
| Kİ-MKH | Taşıyıcı | 5-FU | Safra kanalı kanseri | Eksozom aracılı taşıma ile anti tümör etkisinde artış. | (M. Chen vd., 2022) |
| AD-MKH | Taşıyıcı | miRNA-381 | Meme kanseri | EMT ile ilgili protein ekspresyonda inhibisyon. | (Shojaei vd., 2021) |
| AD-MKH | Terapi Hedefi | FOXM1 | Ovaryum kanseri | Metastaz ve kanser progresyonunda artış. | (Qu vd., 2022) |
| Kİ-MKH | Görüntüleme | FTH1 | | MRI görüntüleme teknolojisine elverişlilik. | (T. Liu vd., 2020) |

## 1.2. Nanomalzemeler

### 1.2.1. Nanomalzemelerin Sınıflandırılması

Nanomalzemeler (NM), en az bir boyutu 1 ile 100 nm aralığında olan malzemelerdir. 0-Boyutlu (0-B) nanomalzemeler; her üç boyutu da 100 nm den küçük olan, 1-Boyutlu (1-B) nanomalzemeler; bir boyutu> 100 nm olan, 2-Boyutlu (2-B) nanomalzemeler; iki boyutu > 100 nm olan malzemelerdir. 3-Boyutlu (3-0) nanomalzemeler ise 0-B, 1-B, ve 2-B nanomalzemelerin kaynağını oluşturan kütlesel bloklardır ve üç boyutu da nano boyuttan büyüktür (Şekil 1.4.). Nanomalzemeleri; boyutsallıkları, morfolojileri, porlulukları, içerikleri ya da orijinlerine göre sınıflandırılabilmek mümkündür (Harish vd., 2022). Ancak onları aynı kompozisyona sahip olan diğer malzemelerden ayıran ve eşsiz kılan en temel iki özelliği: boyutları ve yüzey özellikleridir.




**Şekil 1.4.** Nanomalzemelerin, boyutlarına göre sınıflandırılması.

Nanomalzemeler; boyuta bağlı farklı davranışlar sergilerler ve boyutları küçüldükçe kuantum etkileri belirgin şekilde artar. Örneğin; manyetik özelliği olmayan mikron boyutundaki Altın malzeme, nano boyutlara indikçe manyetik karakter kazanabilir (Roduner, 2006). Malzeme boyutu nano boyuta ulaştıkça, malzemenin yüzey alanı ve yüzeydeki atom dağılımı artar. Nanomalzemelerin değişen yüzey özelliklerine bağlı olarak aglomerasyon, hidrofiliklik/hidrofobiklik, çözünürlük, optik özellikleri gibi tüm karakterleri anlamlı şekilde değişir (Joudeh & Linke, 2022). Geniş yüzey alanları, fonksiyonel grupları ve nano ölçekli boyutlarından kaynaklanan istisnai fizikokimyasal özellikleri nedeniyle nanomalzemeler;

kanser tedavisi, ilaç/gen konjugasyonu, doku mühendisliği, biyolojik görüntüleme, sensör teknolojileri gibi birçok alanda ilgi odağı olmuştur (Zhe Cheng vd., 2021).

### 1.2.2. Kanser Çalışmalarında Nanomalzemelerin Yeri

Nanomalzemeler; küçük boyutları ile biyolojik membranları kolaylıkla geçebilirler ve geniş fonksiyonel yüzey alanları, yüksek miktarda terapötik ajan yüklemeye elverişlidir (Cojocaru vd., 2020). Benzersiz fizikokimyasal özelliklerinin sağladığı doğal floresan yeteneği sayesinde, ek bir ajan konjugasyonu gerekmeksizin görüntüleme sistemlerinde kullanılabilmektedir (Q. Wu vd., 2020). Şekil, boyut, yüksek suda çözünürlük ve düşük toksisiteleri sayesinde biyolojik sistemlerle uyum sağlayabilir, böylece terapötik işlevselliğin iyileşmesine destek olabilirler (Kashyap vd., 2023). Tüm bu özellikler göz önüne alındığında nanomalzemeler; kanser tanı, görüntüleme ve tedavi alanlarında yapılan araştırmalar için oldukça heyecan vericidir.

Terapötik ajanların özgüllüğünü ve etkinliğini artırmak için aktif ve pasif stratejiler kullanılır. Pasif hedeflemenin altında yatan mekanizma; Arttırılmış Geçirgenlik ve Tutulma (EPR) etkisidir. Bu mekanizma, tümör kan damarlarının artan sızıntısı ve zayıf lenfatik drenaj nedeniyle nanopartiküllerin tümör dokuları içinde birikimini ve tümör bölgesinde uzun süre tutulmasını sağlar (Izci vd., 2021)**,** (Ejigah vd., 2022). Aktif hedeflemede ise; nanomalzemelerin yüzeyine peptitler, antikorlar, küçük moleküller veya aptamerler gibi dokuya özgü ligandlar konjuge edilerek aktif kanser hedeflemesi gerçekleştirilir (Bai vd., 2023) (Deepshikha Gupta vd., 2024). Bunun yanı sıra nanomalzemeler, yüksek Glutatyon (GSH) seviyeleri ve asidik pH değeri gibi TME' nin sağlıklı dokulardan farklı olan özelliklerine yanıt verecek şekilde da tasarlanabilir (J. Liu vd., 2021), (Chu vd., 2022)**.** Bu sayede, tümör dokusunda birikim artırılarak daha az miktarda ilaç veya nanomalzeme kullanımıyla yüksek etkinlik sağlanabilir ve hedef dışı yan etkiler azaltılabilir (Z. Zhang vd., 2023).

### 1.2.3. Nanomalzeme Enkapsülasyonunun Önemi

Nanomalzemelerin biyolojik sistemlerdeki davranışları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle küçük boyutları uygulama alanında kayda değer avantajlar sunsa da *in vivo* ortamda kontrolsüz dağılım ve hedef olmayan dokularda birikme gibi dezavantajlarını da beraberinde getirir. Bu engelleri minimalize edebilmek için, yüzey modifikasyonlarının veya lipozomlar gibi taşıyıcı sistemlerin kullanılması, nanomalzemelerin istenilen hücre tipine yönelimi geliştirilerek, tedavi etkinliği ve güvenliği arttırılabilir (Zesheng Cheng vd., 2022).

İdeal bir taşıma sistemi; nanomalzemeleri *in vivo* degredasyondan korumalı, düşük toksisite ve immünojenite sergilemeli, hücreler tarafından etkili bir şekilde hücre içine alınmalı, stabilite ve endozomal kaçış sağlamalı, istenmeyen birikmeyi önleyen bir zamanda biyolojik olarak bozunabilmeli ve kargosunu hedef bölgede serbest bırakabilmelidir (Ledesma vd., 2022). Eksozomlar, bahsi geçen kriterleri karşılayabilen ideal taşıyıcılar olarak değerlendirilmektedirler (V. Sharma & Mukhopadhyay, 2024).

Nanomalzemeler biyolojik sıvılarla temas ettiğinde, proteinler nanomalzeme yüzeyi ile etkileşir ve nanomalzemenin etrafında Protein Korona (PC) olarak isimlendirilen bir tabaka oluşturur (Heidarzadeh vd., 2023). PC; nanomalzemenin fizikokimyasal özelliklerini, hücre hedefleme kapasitesini ve hücre internalizasyon yolaklarını değiştirebilir (García-Álvarez vd., 2018). Nanomalzemelerin eksozom içine yüklenmesi, *in vivo*da etkileşeceği dış faktörlere karşı bariyer görevi görerek PC oluşumunu ve enzimatik degredasyonu azaltabilir. Böylece nanomalzemelerin biyoaktif özellikleri korunarak hedef bölgeye ulaşımı sağlanabilir (J.-Y. Wu vd., 2021).

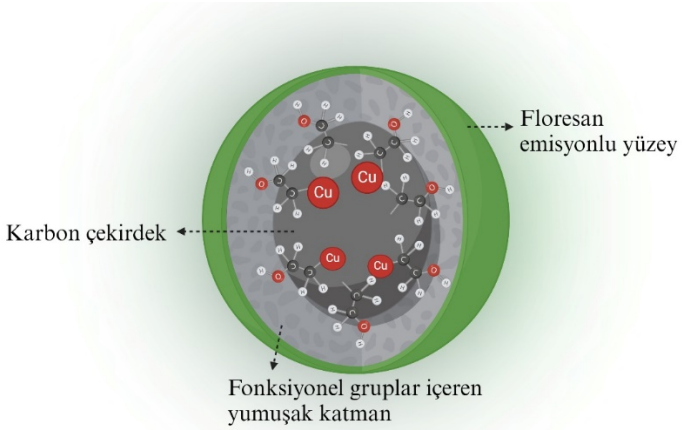
Nanomalzemeler eksozomlara yüklendiğinde; eksozomların yüksek biyouyumluluğundan, anti-fagositik sinyali sayesinde (eksozom membran CD47 molekülü) bağışıklık sistemi tarafından eliminasyonun azalmasından ve hedeflenen dokularda daha fazla birikme sağlayabilme özelliklerinden faydalanılmış olur (H. Kim vd., 2020). Ayrıca, daha fazla ilaç taşıma kapasitesi, kolay ölçeklendirilebilme, yüzey özelliklerinin ayarlanabilir olması ve ilacın kontrollü şekilde salınımı gibi avantajlar da sağlanmış olur (Lopes vd., 2023).

Nanomalzemelerin eksozomlara yüklenerek kullanılması; kanser hücrelerinde bulunun İlaç Direnç Mekanizmalarının (İDM) üstesinden gelebilmek için potansiyel bir stratejidir (G. Zhou vd., 2022). Terapötik molekülün, kanser hücreleri tarafından başarılı ve etkili bir konsantrasyonda alınması, etkinliği ve tedavi başarısında belirleyici bir faktördür. Eksozomlar, derin doku penetrasyonu sağlayabilir, düşük pH ve yetersiz oksijen gibi fiziksel bariyerleri aşarak İDM mekanizmalarını baypas edebilir ve içeriğini hücre içine serbest bırakabilir (Ming-Kun vd., 2024). Bunun yanı sıra, eksozomlar, taşıdıkları miRNA' lar aracılığı ile İDM' nda etkili moleküler yolakları inhibe edebilir (L. Jiang vd., 2021).

### 1.2.4. Karbon Dotlar

#### 1.2.4.1. Karbon Dot Sentezi ve Özellikleri

Karbon Dot' lar (CD); boyutları 10 nm den küçük, yüksek floresan özelliğine sahip, düşük toksisiteye ve çok miktarda fonksiyonel gruba (karboksil, hidroksil, amino ve/veya aromatik) sahip 0-boyutlu karbon nanomalzemelerdir (H. Liu vd., 2024). Karbon Dot' lar politiyofen (Jin vd., 2021) , üre (H. Qi vd., 2023), sitrik asit (Fiori vd., 2022) gibi karbon kaynağı öncül maddelerden elde edilir. Karbon Dot sentezinde kullanılan iki temel metot vardır: yukardan-aşağıya (top-down) ve aşağıdan-yukarıya (bottom-up). Yukarıdan-aşağıya yönteminde CD' lar; karbon kaynağı kütlenin hidrotermal, elektrokimyasal veya asit oksidasyonu gibi parçalama teknikleriyle nano ölçekli karbon malzemelere indirgenmesi sonucu elde edilir (Nocito vd., 2021). Aşağıdan-yukarıya sentez yönteminde ise, moleküler öncüller mikrodalga, hidrotermal veya termal piroliz yöntemleri ile karbonize edilerek CD' lar sentezlenir (Kirbas Cilingir vd., 2021).




**Şekil 1.5.** Karbon Dot'un şematik görünümü. Sakdaronnarong vd. (2020)'nin çalışmasından esinlenilmiştir (Sakdaronnarong vd., 2020).

Karbon Dot' lar; küçük boyutları, zengin fonksiyonel grupları ve floresan özellikleri ile görüntüleme, aktif molekül taşıma, fototerapi gibi birçok biyomedikal uygulamaya imkan sağlayan biyouyumluluğa sahiptir (Xueting Li vd., 2023). Ancak, nanomalzemelerin metabolize edilemediği taktirde biyolojik sistemlerdeki birikimi kronik sağlık problemlerine sebebiyet verebilir (Xue Li vd., 2020). Karbon Dot çekirdekleri, vücut sistemlerinde modifikasyona ve bozunmaya karşı oldukça dirençlidir ve bu sebeple büyük ölçüde metabolize edilmeden vücuttan atıldığı düşünülmektedir. Karbon Dot' ların kalıcılığı sadece boyutlarına değil aynı zamanda fonksiyonel grupların stabilitesi ve diğer moleküller ile olan etkileşimine de bağlıdır. Bu sebeple; CD 'un tamamının metabolize edilmesi gerekli olmayabilir, proteinlere veya diğer makromoleküllere bağlanan kısımların çıkarılması veya modifikasyonu vücuttan temizlenmeyi artırabilir (Lee vd., 2016).

Karbon Dot sentezinde kullanılacak yöntem ve seçilen öncül madde, CD' un fizikokimyasal özelliklerini ve toksisitesini belirler (Yanyan Wu vd., 2021). Nötral yüke yakın nanomalzemelerin, pozitif ve negatif yüklü nanomalzemelerle karşılaştırıldığında biyomedikal uygulamalar için daha güvenli olduğu düşünülmektedir. Yüksek dozda dahi hücre morfolojisinde bir değişime sebep olmadıkları, sitotoksik etkiye sahip olmadığı ve hücre döngüsünde herhangi bir anormalitenin uyarılmadığı gösterilmiştir (Havrdova vd., 2016). Toksisitenin azaltılması, floresan yoğunluğunun ve stabilitesinin artması için araştırmacılar yeşil senteze yönelmişlerdir. Çevre dostu olmaları, düşük maliyetleri, terapötik özellikleri ve kolay ulaşılabilirlikleri nedeniyle hayvan kabukları, bitki tohum ve yaprakları gibi doğal kaynaklar, CD' ların geliştirilmesinde tercih edilmeye başlanmıştır (Gedda vd., 2023).

### 1.2.4.2. Karbon Dot'ların Hücre İnternalizasyonu

Nanomalzemelerin hücresel alım yolu; malzemenin boyutu, şekli, yüzey yükü, yüzey işlevselliği, bant aralığı enerjisi, gözeneklilik, kristallik, çözünürlük ve diğer makromoleküllerle ilişkiler dahil olmak üzere çok sayıda faktöre bağlıdır (Truskewycz vd., 2022). Fotodinamik Terapi ve nanomalzemelerin eksozomlara parental hücre inkübasyon yöntemi ile yüklenebilmesi için nanomalzemelerin hücre içine alınması kritik bir adımdır.

Pozitif yüklü nanomalzemeler, çoğunlukla klatrin ya da pinositoz aracılı endositoz yolağı ile hücre içine alınırken, negatif yüklü nanomalzemelerin ise daha çok kollestrol bağlı bir mekanizma kullanma olasılıkları yüksektir. Nanomalzemelerin, enerji bağlı internalizasyonları, difüzyon sistemlerindeki gelişigüzelliğe istinaden hücre tipine göre farklılıklar gösteren bir kontrol mekanizması altında gerçekleştiği için istenmeyen yan etki ihtimali azalır (Francia vd., 2020). Pozitif yüklü nanomalzemelerin, hücre membranındaki negatif yüklü bileşenler ile etkileşimi sayesinde internalizasyonunun arttığı belirtilse de pozitif yük, toksisite ve inflamatuar yanıt ile ilişkilidir (Mohammadinejad vd., 2019), (Usman vd., 2020).

Nanomalzemeler ve hücre zarı arasındaki ligand spesifik etkileşimlerden ziyade, spesifik olmayan yüklü yüzeyler, hidrofobik yapı, fonksiyonel gruplar ve hücre membran moleküllerinin etkileşimi Klatrin/Kaveolin Bağımsız Endositoz yolunu tetikleyebilir. Ancak bu bağımsız endositoz aktivasyonunun CD' lar ile olan ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Almeida vd., 2021). Malzeme boyu küçülüp kuantum karakterler kazanıldıkça hücresel internalizasyon yolakları daha da tartışmalı bir hal almaktadır. Yüzey yükündense, farklı hidrofobiklik dereceleri farklı sonuçların bir sebebi olabilir. Dahası, hücrelerin yüklü nanomalzemeleri alma tercihleri, amin ve karboksil fonksiyonel gruplardan kaynaklanıyor olabilir (Fröhlich, 2012). Karbon Dot yüzey yükü, belirli bir endositoz mekanizmasına yönelik herhangi bir özgüllük göstermezken, yüzeylerinde ihtiva ettikleri fonksiyonel gruplar hücre alımındaki yolakların spesifikleşmesinde etkilidir. Yüzeylerinde karboksil grupların varlığı, klatrin-aracılı endositozu arttırır, ancak bu durum doku/hücre spesifiktir (Yadav vd., 2023).

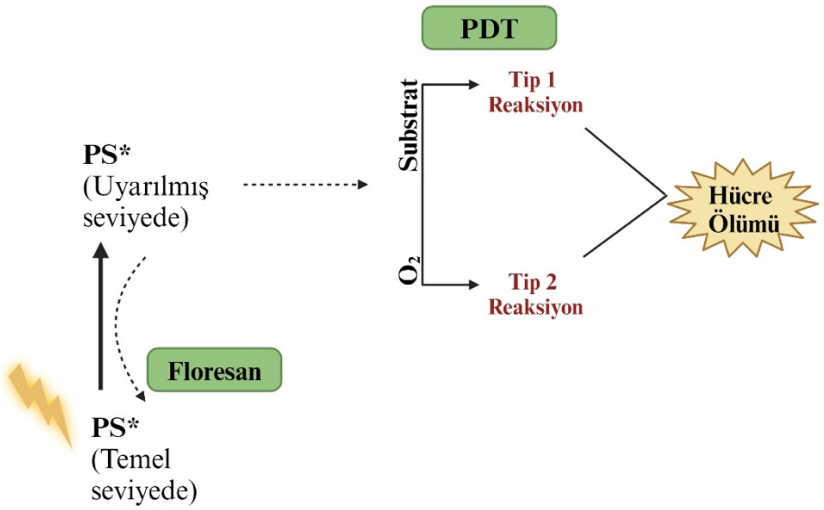
Endositoz ile hücre içine alınan CD' ların erken endozoma dahil olarak ekstraselüler veziküller içine yüklenebilmesi için, lizozomal yolaktan kaçabilir olması gerekir. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler (Kİ-MKH) inkübasyonunda, CD' ların tercih ettiği birincil yolağın Klatrin-Aracılı Endositoz olduğu, az miktarda CD' un pasif transportla hücre sitoplazmasına internalize olduğu gösterilmiştir. Lizozomlarda lokalize olan CD miktarının oldukça az olması, hücreye alınan CD' ların büyük bir kısmının muhtemelen lizozom kaçış sergilediğinin göstergesi olarak yorumlanmaktadır (Bu vd., 2020). Umblikal Kord Mezenkimal Kök Hücrelerle (UK-MKH) inkübe edilen CD' ların endositoz ile hücreye alındığı ve erken endozom belirteçleri ile kolokalize olduğu gözlenmiştir (B. Jiang vd., 2022).

Wei. ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada; zeta potansiyeli +29,6 mV ve ortalama boyu 10,84 nm olan CD' ların Adenoid Kistik Karsinoma (ACC-2) hücrelerinde temel internalizasyon yolağının enerji bağımlı mikropinositoz olduğunu göstermişlerdir (Y. Wei vd., 2019). Zhou ve arkadaşları ise, zeta potansiyeli +2,3 mV ve boyut aralığı 1-5 nm olan CD' ların düşük sıcaklık ve ATP' den yoksun ortamda internalizasyonun yaklaşık %60 düştüğünü belirterek bu veriyi desteklemişlerdir. Ancak; pasif difüzyon gibi enerji bağımsız bir yolağın da hala devrede olduğu belirtilmiştir. Karbon Dot internalizasyonunun birincil yolağının kaveola aracılı endositoz olduğu ve klatrin aracılı yolağın da endositoza dahil edildiği belirtilmiştir. Pinositozun ise CD internalizasyonunda önemli bir rol oynamadığı gözlenmiştir. Karbon Dot inkübasyonunun beşinci dakikasından itibaren hücre membranında birikmeksizin sitoplazmada dağılım gösterdikleri, 15 nci dakikadan sonra da çekirdek içinde lokalize oldukları gösterilmiştir (N. Zhou vd., 2014).

## 1.3. Fotodinamik Terapi

### 1.3.1. Fotodinamik Terapi ve Nanomalzemeler

Fotodinamik Terapi (PDT); ışığa duyarlı bir malzemenin spesifik bir dalga boyu ışık ile uyarılmasını takiben ortamdaki oksijeni sitotoksik bir forma dönüştürmesi prensibine dayanan bir kanser terapi yöntemidir (Dong vd., 2023). Işık ile uyarılan fotosensitizer (PS, fotoaktif malzeme) elektronları, durağan seviyelerine geri dönerken enerji salınımı meydana gelir. Bu enerji hücre membranı ya da bir biyomolekül oksijenine transfer edilirse Tip 1, ortamdaki moleküler oksijene transfer edilirse Tip 2 reaksiyonu gerçekleşir ve $^1O_2$, $H_2O_2$, **.**OH ve/veya süper oksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalleri oluşur. Oluşan ROS (Reaktif Oksijen Türleri), hücrede toksisiteye sebep olarak hücre ölümünü tetikler (D. Sharma vd., 2023).




**Şekil 1.6.** Fotodinamik Terapi mekanizmasının şematize edilmesi

Fotodinamik Terapi' nin üç temel bileşeni vardır; ışık, PS ve oksijen (J. Zhao vd., 2020). Foto aktif malzemenin hücre internalizasyonu kadar, malzemeyi aktifleştirecek ışık kaynağının da malzemeye ulaşabilmesi bir o kadar önemlidir. Mavi ışık alanı, yüksek enerjisinden dolayı, biyolojik sistemlerde hasara verici olabilir ve aynı zamanda penetrasyon oranı da düşüktür. Kırmızı alana yaklaştıkça derin doku penetrasyonu artar. Çevre doku hasarı azalarak, derin noktalardaki PS' ye ulaşma ihtimali de artar (Barbora vd., 2021).

Fotodinamik Terapi başarısı fotoaktif malzemenin derin doku penetrasyonu, hassas hedef belirleme yeteneği, tümör mikroçevresindeki oksijen miktarına bağlıdır (L. Yu vd., 2024). Nanomalzemelerin; küçük boyutları ile derin doku penetrasyonu sağlayabilmeleri, EPR etkisi ile tümör alanında uzun süreli birikimi, ilaç taşıma yetenekleri ile kombine tedavilere elverişliliği, fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanabilirliği ve hedef belirleme modifikasyonlarına uyumluluğu, yüksek suda çözünürlük ve uygulama kolaylıkları PDT uygulamalarında onları oldukça çekici kılmaktadır (Younus vd., 2024).

### 1.3.2. Eksozom Aracılı Fotodinamik Terapi

Eksozomların; hedef belirleme yetenekleri, biyouyumlulukları, yükleme kapasiteleri, immünomodülasyon katkıları, KBB' yi aşabilmeleri ve hali hazırda sahip oldukları aktif biyomolekül içerikleri göz önüne alındığında, PS' lerin etkili şekilde hedefe ulaştırabilmelerinde oldukça başarılı olmaları kaçınılmazdır.

Fotodinamik Terapi başarısını etkileyen en temel unsurlardan biri, PS' nin tümör doku akümülasyonudur. Eksozomlar; yüksek hedefleme kapasitesine sahiptir ve ilaç direnç mekanizmalarına karşı dayanıklıdır. Bu da eksozomların taşımakta olduğu içeriğini daha fazla hedef hücreye ulaştırabilmesi, aynı zamanda istenmeyen yan etkilerin azalması anlamına gelir (Akbari vd., 2023). Bununla beraber, nanomalzemeler eksozomlarla taşındığında hem daha uzun süre sistemde varlığını korumuş hem de degradasyon ve eliminasyon riskini minimalize etmiş olur (Zeng vd., 2023). Eksozomlar hedef hücre internalizasyonunu gerçekleştirdikten sonra büyük oranda endozomal kaçış sağlayabilir. Bu da, taşımakta oldukları PS' lerin aktif olarak hücre sitozolüne salınımını sağlar (Heath vd., 2019).

Eksozomların, PDT başarısını arttıran bir diğer avantajı da hali hazırda sahip oldukları biyomoleküler içerikleridir. Taşıdıkları protein ve özellikle miRNA' lar sayesinde farklı hücre ölüm yolaklarına müdahale ederek kombine terapilere imkân sağlayabilir (Yuan vd., 2020).

**Çizelge 1.6.** Eksozom aracılı PDT yaklaşımlarına örnek çalışmalar.

| Eksozom Kaynağı | Nanomalzeme | Hedef | Referans |
|---|---|---|---|
| Melanoma, B16F10 | HGN, 45 nm | Melanoma, B16F10 | (Sancho-Albero, Encabo-Berzosa, vd., 2019) |
| Makrofaj, RAW 264.7 | Ir3, 25 nm | Fare meme kanseri, 4T1 | (Kang vd., 2024) |
| Meme kanseri, MCF 7 | V2C-TA QD, 15 nm | Meme kanseri, MCF 7 Fibroblast, NHDF Akciğer kanseri, A549 | (Y. Cao vd., 2019) |
| Ürin | AuCe6, 15 nm | Mide kanseri, MGC803 | (Pan vd., 2020) |
| Mezenkimal kök hücre, MKH | Porfirin | Meme kanseri, MDA | (Fuhrmann vd., 2015) |
| Melanoma, A375 | Ir-Fe, 25 nm | Melanoma, A375 | (Feng vd., 2023) |
| Ağız yassı hücreli karsinoma, SCC7 | İndosiyanin yeşili ve Gefitinib | Ağız yassı hücreli karsinoma, SCC7 | (M. Li vd., 2024) |
| Makrofaj, RAW 264.7 | C6 + $SiO_2$ | Kolorektal kanser, C26 | (R.-Y. Zhang vd., 2024) |
| Glioblastoma, U87 | ZnS, | Glioblastoma, U87 | (Wenxu Liu vd., 2023) |

Karbon Dot' lar eşsiz fizikokimyasal özellikleri ile iddialı birer PS olmaya adaydır. Özellikle küçük boyutları sayesinde derin doku penetrasyonuna elverişlidir ve yeşil dalga boyunda aktifleşmesi, biyolojik sistemlerde güvenli alan kabul edilmektedir. Ancak her nanomalzeme gibi CD' lar için de taşıyıcı sistemlerle çalışmak, uygulama güvenliliği ve etkililiğinin artmasında kritik bir öneme sahiptir. Eksozomlar; biyoaktif içerikleri, yüksek hedef belirleme kapasiteleri ve biyolojik bariyerleri aşabilme yetenekleri göz önüne alındığında ilaç taşıma stratejilerinde adeta çığır açmaktadır.

Bu tez çalışması; nanomalzeme bilimi ve eksozom teknolojilerinin entegrasyonu ile kanser tedavilerine yenilikçi bir bakış açısı katmayı hedeflemektedir. Eksozomların, Chl-CD' lar için iyi birer taşıyıcı olabileceği öngörülmüş ve eksozom kaynağı olarak (İnsan Plasental Mezenkimal Kök Hücre) hpMKH' ler tercih edilmiştir. Karbon Dot yüklü MKH eksozomlarının ($CD@EXO_{MKH}$), kanser hücrelerinde PDT yanıtı değerlendirilmiştir. Tez çalışmasında; serbest uygulanan Chl-CD' lar ile karşılaştırıldığında, eksozomlar aracılığıyla taşınan Chl-CD' ların daha etkili bir terapötik yanıt göstereceği hipotezi öne sürülmüştür.

# 2. GEREÇ ve YÖNTEM

## 2.1. Karbon Dot Sentezi ve Karakterizasyonu

### 2.1.1. Karbon Dot Sentezi

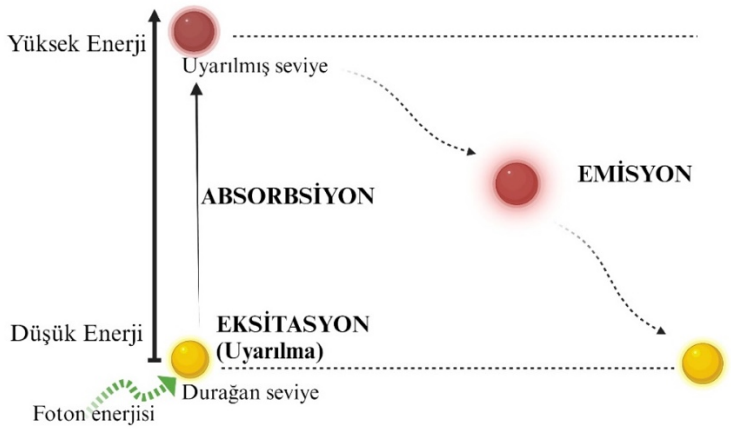
Ispanak, yüksek miktarda klorofil içeren bir sebzedir. Klorofil, yakın kızılötesi (NIR-Infrared) emisyon özelliğine sahiptir ve CD sentezi için prekürsör olarak kullanılabilmektedir (R. Liu vd., 2019). Bu tez çalışmasında, bir klorofil türevi olan Sodyum Bakır-Klorofilin' den (Sigma-Aldrich) sentezlenen CD' lar (Chl-CD) kullanıldı. Sentez yöntemi olarak aşağıdan yukarıya tekniği tercih edildi. Chl-CD' lar; Miami Üniversitesi, Kimya bölümünde sentezlendikten sonra iş ortaklığı dahilinde tarafımıza gönderildi (Kirbas Cilingir vd., 2024).

### 2.1.2. Karbon Dot' ların Optik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Ultraviyole- Görünür Spektroskopi (Ultraviolet and Visible Spectroscopy (UV-VIS)); ultraviyole (10-400 nm) ve görünür (400-800 nm) dalga boyundaki ışık yoğunluğunu ölçmek için kullanılan spektrofotometrik bir yöntemdir. Fotonlar aracılığı ile bir moleküle transfer edilen enerji, molekül tarafından emildiğinde (Absorbsiyon), elektronların temel (durağan) seviyesinden uyarılmış enerji seviyesine sıçramasına sebep olabilir. UV-VIS; bünyesinde bulundurduğu bir ışık kaynağı, monokramotör ve detektör sistemi ile maddenin absorbe ettiği ışık miktarını ölçer. Absorbsiyon, molekülün elektronik konfigürasyonu ile ilişkilidir. Elektronların dahil olduğu bağlar ve enerji seviyelerine göre, molekülün absorbe edeceği ışık dalga boyu ve miktarı değişkenlik gösterir. Absorbans, madde için karakteristiktir. Aynı zamanda absorbans yoğunluğu, örnekteki madde miktarı ile de doğru orantılıdır ve madde miktarı arttıkça, absorbe edilen ışık miktarı da artar.

Bir elektron enerji absorbe ettiğinde, uyarılmış enerji seviyesine yükselir. Ancak daha sonra durağan haline geri döner ve bu esnada absorbe ettiği enerjiyi dışarıya geri yayar (Emisyon). Durağan seviyeye dönerken yaydığı bu enerji floresan bir ışıma olarak gerçekleşebilir. Molekülün emisyonu da tıpkı absorbsiyonu gibi karakteristik bir optik özelliktir. Moleküllerin floresan optik özellikleri, Fotolüminesans Spektroskopi (Photoluminescence Spectroscopy (PL)) ile ölçülebilir. Çalışma prensipleri UV-VIS ile benzer olsa da UV-VIS' den farklı olarak PL' de emilen değil, yayılan ışık ölçümü yapılır. Özetle

UV-VIS' de düşük enerji seviyesinden yüksek enerjiye geçiş (Absorbsiyon), PL' de ise yüksek enerjiden düşük enerji seviyesine dönüş (Emisyon) ölçülür (Şekil 2.1.).



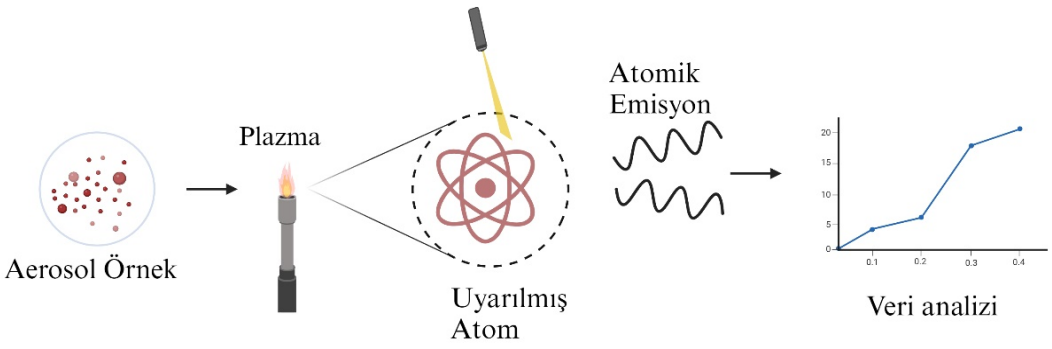

**Şekil 2.1.** Fotolüminesans Spektroskopide Eksitasyon, Absorbsiyon ve Emisyonu tanımlarının şematik gösterimi.

Karbon Dot, hassas terazide 2 mg tartıldı 2 ml Fenol Kırmızısı içermeyen besiyeri içinde süspanse edilerek 1mg/ml konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan dilüsyonlar UV-VIS ve PL Spektroskopilerine uyumlu şeffaf küvetlere (Quartz Cuvette, Starna Cells Inc.; Atascadero, ABD) 2ml olacak şekilde dağıtıldı. UV-VIS ölçümleri için; Chl-CD içermeyen besiyeri referans ölçümü için kullanıldı. 200 nm- 800 nm dalga boyu aralığında absorbans taraması yapıldı (Shimadzu UV-2600i). Floresan emisyonları için; farklı dalga boylarında (390-600 nm) uyarılarak maksimum emisyon verdiği alan belirlendi (Perkin Elmer LS55).

UV-VIS ve PL; moleküllerin hem optik karakterizasyonunda hem de madde miktarı hesaplamasında kullanılan spektroskopik yöntemlerdir. Karbon Dot'ların optik karakterizasyonu için UV-VIS ve PL ölçümleri Zaragoza Üniversitesi NFP araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

### 2.1.3. Karbon Dot Solüsyonlarındaki Bakır İçeriğinin Analizi

Mikrodalga Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi (MP-AES), metal içerikli malzemelerin elemental analizini yapmak için kullanılan bir tekniktir. Sıvı formdaki örnek, ilk olarak bir nebulizer yardımı ile aerosol forma dönüştürülür. Cihaz içinde bulunan manyetron, manyetik bir alan oluşturarak sistemdeki nitrojenden bir plazma oluşturur. Aerosol bu plazma ile buluştuğunda kurur ve atomize olur. Bu aşamada örnek, her bir element için spesifik olan dalga boyunda ışık ile uyarılır. Elementin bir atomu uyarıldığında karakteristik bir emisyon yayar. Bu emisyon bir CCD detektör yardımı ile işlenir ve numune içindeki elementin miktarı belirlenir (Şekil 2.2.). MP-AES için, bir numunedeki elementin tespit limiti ppm seviyesindedir (milyonda bir tespit, 1 ppm=1 mg/L).




**Şekil 2.2.** Mikrodalga Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi çalışma prensibi şematik gösterimi.

Kalibrasyon eğrisini oluşturmak için 1:5 oranında su ile seyreltilmiş Agua Regia (1 hacim nitrik asit ve 3 hacim hidroklorik asit karışımı) içinde ticari olarak temin edilen Bakır standartlarından seri dilüsyonlar hazırlandı (Kat. No: 5190-8280, Agilent Technologies). Ölçümü yapılacak olan Chl-CD örnekleri için su içinde seri dilüsyonlar hazırlandı. Her 200 µl Chl-CD serisine 200 µl Aqua Regia eklendi ve oda sıcaklığında 24 saat sindirim gerçekleştirildi. Sürenin sonunda final hacim, su ile 1 ml ye tamamlandı ve örnekler 0,2 µm şırınga filtresinden (Kat. No: 186009314, Acrodisc Syringe Filter, Waters Corporation, ABD) geçirildikten sonra 324.754 nm dalga boyunda okutuldu (MP-AES 4100, Agilent Technologies, Santa Clara, ABD). Karbon Dot'ların kompozisyonunda bulunan Bakır elementinin analizi için MP-AES ölçümleri, Zaragoza Üniversitesi NFP araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

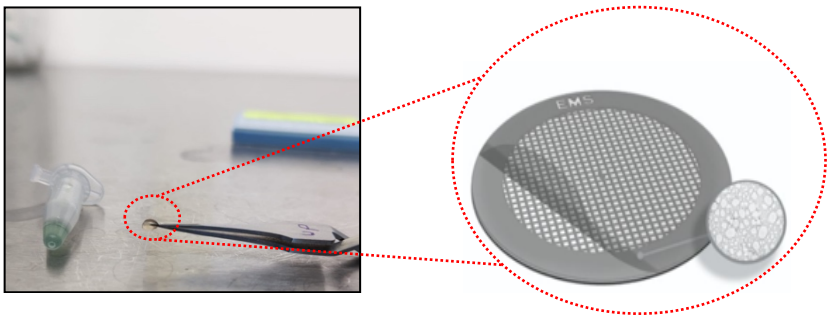
### 2.1.4. Karbon Dot' ların Morfolojik Yapısının İncelenmesi

Karbon Dot'ların boyut ve morfoloji analizleri için Transmisyon Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy, TEM, FEI Tecnai T20) ve Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu (Scanning Transmission Electron Microscopy, STEM, FEI Titan Low-Base 60-300) kullanıldı. STEM görüntülemeleri esnasında mikroskoba takılan Enerji Dağıtıcı X-Işını dedektörü (Energy Dispersive X-Ray, EDX) yardımı ile Chl-CD' ların elemental analizi gerçekleştirildi.

EDX, numunenin bir elektron demeti ile ışınlamasına dayanır. Elektronlar numune yüzeyine çarptığında iç kabuk elektronları dışarı fırlatır, dış kabuk elektronlarının iç kabukta oluşan boşluğu doldurmak için geçişi X ışınları üretir. Her element, benzersiz atomik yapısından dolayı karakteristik bir X ışını emisyon deseni üretir ve böylelikle elemental analiz yapabilmeyi mümkün kılar (Takaku vd., 2020).

Deiyonize su içinde süspanse edilen 50 µg /ml konsantrasyondaki Chl-CD' lar 30 dakika boyunca sonike edildi. TEM görüntüsü ve EDX analizleri için 5 µl Karbon Dot hızlıca karbon kaplı Nikel ızgaraya (Holey Carbon- Ni Grid, Kat No:, HC200-Ni, Electron Microscopy Sciences, ABD) transfer edildi (Şekil 2.3.). Ardından ızgaralar çeker ocak altında 3 saat kurumaya bırakıldı. TEM, STEM, ve EDX analizleri Zaragoza Üniversitesi NFP araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

Partikül büyüklükleri Fiji 2, versiyon 2.3.0/1.53t programında n > 100 olacak şekilde ölçülüp istatistiksel analizleri GraphPad Prism 8 versiyon 8.4.3.(471) kullanılarak gerçekleştirildi.



**Şekil 2.3.** TEM ızgaralarının hazırlanması.

## 2.2. Karbon Dot'ların Hücre İnternalizasyonu

### 2.2.1. Karbon Dot İnternalizasyonunun Görüntülenmesi

Karbon Dot'ların internalizasyonunu takip edebilmek için nanomalzemenin kendi optik özelliğinden faydalanıldı. Bu bağlamda; PL Spektroskopisi'nde belirlenen Chl-CD'ların maksimum eksitasyon ve emisyon gösterdiği dalga boyları kullanıldı. Hücreler, 20000 hücre/kuyu olacak şekilde 8 kuyulu cam tabanlı kültür kabına ekildi (Lab-Tek II Chamber Slide, 8 Well Glass Slide, Kat. No: 154534, Nunc, ABD) ve hücrelerin yüzeye tutunması için 24 saat inkübe edildi. Besiyerleri aspire edildikten sonra hücreler 200 µl PBS ile yıkandı. Kuyulara fenol kırmızısı içermeyen besiyerinde 100 µg /ml konsantrasyonda hazırlanan Chl-CD süspansiyonundan 250 µl eklendi. Kontrol grubu olarak seçilen kuyularda Chl-CD içermeyen besiyeri ile kültüre devam edildi. Hücreler normal kültür koşulları altında 4 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri aspire edildikten sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkanarak internalize olmayan Chl-CD' lar ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler, fikslenmeden fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içinde 405 nm eksitasyon ve 600-700 nm emisyon aralığında görüntülendi (Celldicoverer 7, Zeiss).

### 2.2.2. Karbon Dot İnternalizasyonunun Nicel Analizi

Karbon Dot'ların internalizasyonunu nicel olarak değerlendirmek için nanomalzemenin kendi floresan özelliği kullanıldı. Hücreler 150000 hücre/kuyu olacak şekilde 12 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi ve yüzeye tutunmaları için 24 saat inkübe edildi. Besiyerleri aspire edildikten sonra hücreler 1 kez PBS ile yıkandı. Fenol kırmızısı içermeyen besiyeri içinde hazırlanan farklı Chl-CD konsantrasyonları (0-500 µg /ml) 500 µl kuyulara dağıtıldı ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerleri aspire edilip hücreler 3 kez PBS ile yıkandı. İnternalize olmayan Chl-CD' lar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı. Hücreler, fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ile toplandıktan sonra mikro santrifüj tüplerinde aktarıldı ve 300 g de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp hücre peletleri 200 µl PBS içinde süspanse edildi. Her hücre tipi için Chl-CD' ların intrinsik floresanlarından faydalanarak yoğunlukları ölçüldü.

Farklı inkübasyon sürelerinin internalizasyona olan etkisini değerlendirebilmek için; hücreler sabit konsantrasyonda (50 µg /ml) Chl-CD ile 2, 4, 8, 12 ve 24 saat süre inkübe edildi. Hücreler, 100000 okuma olacak şekilde Akış Sitometrisi'nde okutuldu (Novocyte, Agilent). Canlı hücreler, ileri ve yan saçılımlarına göre kapılandıktan sonra, 400 nm lazer ile uyarılmış hücrelerin Qdot555-H kırmızı alan filtrelerinde floresan kaymaları analiz edildi.

### 2.2.3. Karbon Dot Kaynaklı Bakır Miktarının Ölçümü

Hücresel internalizasyonunu nicel olarak değerlendirilebilmesi için Chl-CD'ların ihtiva ettiği Bakır'dan faydalanıldı. İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)), MP-AES ile benzer çalışma prensibine dayanan bir elemental analiz tekniğidir. MP-AES'den farklı olarak, iyonize edilmiş parçacıklar, kütle spektrometresine yönlendirilir. Her element, karakteristik kütle-şarj oranlarına sahip olduğu için ICP-MS ile örnekteki elementlerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemek mümkündür. ICP-MS' in tespit limiti ppb (milyarda bir tespit, 1 ppb= 1 µg/L) tir. Karbon Dot içindeki bakır miktarı hücre ve eksozomda MP-AES ile tespit edilemeyecek limitlerde olduğundan dolayı, daha hassas ölçümler için ICP-MS ile devam edilmiştir.

İnsan Plasental Mezenkimal Kök Hücreler 300000 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunmaları için inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri aspire edildikten sonra hücreler 1 kez PBS ile yıkandı ve 250 µg/ml konsantrasyondaki Chl-CD' lar ile inkübasyona bırakıldı. Farklı zaman dilimlerinde (0,2,4,8,24 ve 48 saat) Chl-CD' lu besiyerleri aspire edildi. Hücreler, internalize olmayan nanomalzemeleri ortamdan uzaklaştırmak için 3 kez PBS ile yıkandı. Tripsinizasyon işlemi ile hücreler kaldırıldı ve 300 g de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler PBS ile süspanse edildikten sonra Thoma lamında sayıldı. Hücreler tekrar 300 g 5 dakika süre ile santrifüj edilerek pelet haline getirildi ve süpernatant aspire edildi. Hücre peletleri 200 µl Aqua Regia ile gece boyu sindirildikten sonra 0,20 µm şırınga filtrelerinden geçirildi. ICP-MS ölçümleri Zaragoza Üniversitesi NFP Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

## 2.3. Karbon Dot'ların *in vitro* PDT Yanıtının Değerlendirilmesi

### 2.3.1. Hücre Hatları ve Kültür Koşulları

*İn vitro* ortamda kanser hücrelerinin PDT yanıtını değerlendirmek için üç farklı kanser hattı kullanıldı. A549 (İnsan Akciğer Kanser Hattı), 4T1 (Fare Meme Kanser Hattı), U87 ve U251 (İnsan Glioblastoma Kanser Hattı) kültürleri için; eksozom içermeyen % 10 Fetal Sığır Serumu (Exosome Depleted Fetal Bovine Serum (FBS), Kat. No: A2720801, Gibco) ve % 1 penisilin/streptomisin (Pen Strep, Kat. No: 15070063, Gibco) ile tamamlanmış besiyeri (4,5 g/L Glukoz, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Kat. No: 41966029, Gibco) kullanıldı.

Eksozom izolasyonu için kullanılan hpMKH (CET, Coraville, USA) hatlarının kültüründe, eksozomsuz FBS ile tamamlanmış DMEM'e 5 μg/ml Fibroblast Büyüme Faktörü (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor (FGF), Kat No: PHG0264, Thermo Scientific) eklendi.

Hücreler, 37 $^{o}$C sıcaklıkta % 5 $CO_2$ içeren nem koşullarında kültürlendi. Kültür kaplarını % 80-90 oranda kaplayan hücrelerin besiyerleri aspire edildi ve Fosfat Buffer Solüsyonu (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS), Kat No: 14190094, Gibco) ile bir kez yıkanarak besiyerindeki serum uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine kültür kabının yüzeyini kaplayacak miktarda 0,05 Tripsin-EDTA (Kat. No: 25200056, Gibco) eklendi ve 2 dakika 37 $^{o}$C' de inkübe edilerek hücrelerin yüzeyden kalkması sağlandı. Serum içeren tamamlanmış besiyeri ile tripsin aktivasyonu durdurularak, hücreler bir serolojik pipet yardımı ile santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 300g de 4 dakika santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre peleti, bir sonraki adımda yapılacak deney aşamasına bağlı olarak, yeterli miktarda besiyeri ile süspanse edilerek yeni hücre kültür kabına aktarıldı. Hücrelerin çoğalma hızına bağlı olarak, besiyerleri 2- 3 günde bir değiştirildi veya pasajlandı.

### 2.3.2 Karbon Dot'ların Hücre Canlılığına Etkisi

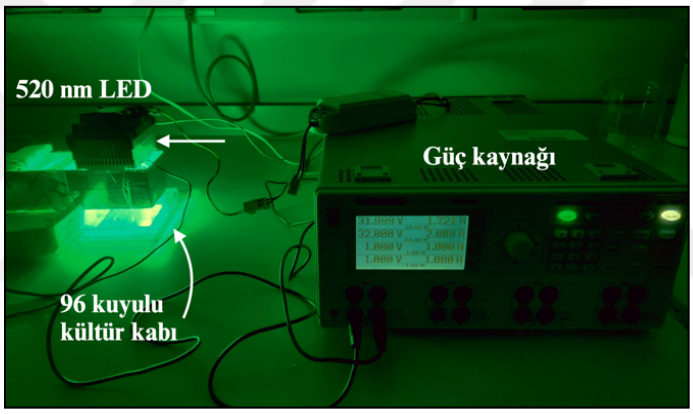
Karbon Dotlar' ın eksozomlara yüklenmesi için hpMKH ile inkübasyon yöntemi kullanıldı. Bu sebeple, Chl-CD' ların hpMKH ile inkübasyon aşamasına geçmeden önce, hücre canlılığına olan etkisi değerlendirildi. Aynı şekilde PDT için uygun konsantrasyonun belirlenmesi ve kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkisinin olup olmadığı test edildi.

Hücre canlılık değerlendirmeleri için Laktat Dehidrogenez Testi (CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (LDH), Kat. No: C20300, ThermoFisher) kullanıldı. LDH; çoğu hücrede bulunan ve sitotoksisite indikatörü olarak da bilinen bir enzimdir. Hücre membranında gerçekleşen bir hasar durumunda, LDH' in hücre dışında salınımı artar. Hücrelerin kültürlendiği besiyerindeki LDH miktarı, spektrofotometrik olarak ölçülebilir ve direkt olarak sitotoksik etkiyle ilişkilendirilir.

Sitotoksisitesi değerlendirilecek olan hücre hattı, 96-kuyulu hücre kültür kabına 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat kültür kabının yüzeyine tutunmaları beklendi. Hücrelerin besiyerleri aspire edildikten sonra 1 kez PBS ile yıkandı ve farklı konsantrasyonlarda Chl-CD içeren (0-500 µg/ml) tamamlanmış 100 'er µl DMEM, kuyulara dağıtıldı. Hücreler 24, 48, 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresini tamamlayan hücrelerin besiyerleri aspire edildi ve internalize olmayan Chl-CD' ları ortamdan uzaklaştırmak için hücreler 1 kez PBS ile yıkandı. Kuyulara 100 'er µl taze DMEM eklendi. Her kuyuya LDH Kit içeriğinde bulunan liziz solüsyonundan 10 'ar µl dağıtıldı ve 45 dakika 37 ºC' de inkübe edildi. Hücreler kuyulardan toplanıp mikrosantrifüj tüplerine transfer edildi ve 13000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre peletlerine dokunmadan, süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir 96-kuyulu kültür kabına 50 µl olacak şekilde aktarıldı. Süpernatantların üzerine aynı hacimde kitten sağlanan reaksiyon karışımı eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyulardaki absorbans 680 nm' de, Synergy HT Bio-Tek spektrofotometre cihazında okutuldu.

### 2.3.3. Kanser Hücrelerinde *in vitro* Fotodinamik Terapi Uygulaması

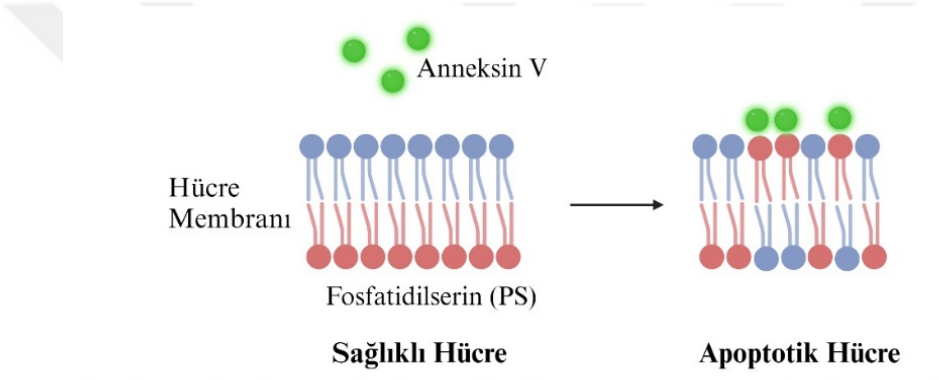
Karbon Dot'ların hangi ışık dalga boyunda aktifleştiğini anlayabilmek için kanser hücre hatları farklı dalga boylarında ışık ile irradiye edildi. Bunun için A549, 4T1 ve U87 kanser hücreleri 96 kuyulu hücre kaplarına 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunmaları için 24 saat normal kültür şartlarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyerleri aspire edildi ve kuyulara 100 µl farklı konsantrasyonlarda Chl-CD içeren tamamlanmış besiyerleri eklendi. Hücreler, 4 saat Chl-CD ile inkübe edildikten sonra besiyeri aspire edildi. İnternalize olmayan Chl-CD'ların ortamdan uzaklaştırılması için hücreler 1 defa PBS ile yıkandı. Kuyulara, Chl-CD içermeyen taze besiyeri eklendikten sonra hücreler ışık kaynakları ile uyarıldı. Hücre canlılıklarını değerlendirmek için 18 saat sonra LDH analizi gerçekleştirildi. PDT deneylerine 520 nm dalga boyundaki ışık ile devam edildi.




**Şekil 2.4.** *İn vitro* Fotodinamik Terapi düzeneği.

### 2.3.4. Apoptoz, Hücre Döngüsü ve ROS Oluşumlarının Değerlendirilmesi

Apoptoz, kontrol edilebilen programlı bir hücre ölüm biçimidir. Nekrotik ölümle kıyaslandığında; doku bütünlüğünü bozmayan, iltihaplanma gibi travmalara sebep olmayan bir süreçtir. Apoptoz sürecine giren hücreler, morfolojik ya da biyokimyasal değişiklikler ile karakterize edilir. Sağlıklı hücrelerde Fosfatidil Serin (PS) hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde yer alırken, apoptotik hücrelerde dış ortama doğru konformasyonunu değiştirir. Bir antikoagülan olan Anneksin V, PS'e yüksek afinite gösterir. Florofor işaretli Anneksin V'in hücrenin dış yüzeyine lokalize olan PS'e bağlanmasıyla Apoptotik hücre tespiti yapmak mümkündür (Şekil 2.5.).




**Şekil 2.5.** Apoptoz tayin kitinin çalışma prensibi

Apoptoz tayini için Apoptoz Kiti (Dead Cell Apoptosis Kits with annexin V for Flow Cytometry, Kat. No.: V13241, Thermo Fisher Scientific) kullanıldı. Kit, Alexa Fluor 488 (FITC) florofor ile konjuge edilmiş Anneksin V ve sadece ölü hücrelerin nükleik asitlerini işaretleyen kırmızı floresana sahip Propidyum İyodür (PI) içermektedir. Hücreler, her iki boya ile boyanarak popülasyondaki canlı, nekrotik ve apoptotik hücrelerin miktarı Akış Sitometrisi'nde belirlenir.

A549 ve U87 kanser hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kabına 500000 hücre/ kuyu olacak şekilde ekildikten sonra yüzeye tutunmaları için 24 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri aspire edilip 1 kez PBS ile yıkadıktan sonra, 1 ml 50 µg/ml konsantrasyonda Chl-CD ile 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, hücreler 1 kez PBS ile yıkanarak internalize olmayan nanomalzemeler uzaklaştırıldı ve kuyulara 1' er ml taze besiyeri eklendi. Karbon Dot içeren besiyeri ile muamele edilen kuyulardan bir tanesi 520 nm ışık ile 1 saat irradiye edildi. PDT uygulaması tamamlandıktan 4 saat sonra, besiyerleri aspire edilerek standart tripsinizasyon

işlemi gerçekleştirilerek hücreler falkon tüp içine toplandı. 300 g 4 dk. santrifüjlendi. Kit içinde bulunan Component C solüsyonu (5X Annexin Binding Buffer) deiyonize su ile 1:5 dilüe edilerek 1X C Solüsyonu hazırlandı. Santrifüj sonunda elde edilen hücre peletleri 100 µl 1X C Solüsyonu ile süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonunun için kitten temin edilen Anneksin V'den (Solüsyon A) 5 µl ve Propidyum İyodür'den (Solüsyon B) 1µl eklendi ve 15 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Hücreler pipet yardımıyla iyice karıştırıldıktan sonra son hacim Solüsyon C ile 500 µl'ye tamamlandı ve Akış Sitometrisi'nde her grup için 100000 hücre okuma alındı.

Fotodinamik Terapi sonrası hücresel ROS oluşumu DCFDA/H2DCFDA ROS Kiti (Cellular ROS Assay Kit, Kat. No.: ab113851, ABCAM, ABD) ile değerlendirildi. DCFDA boyası; (2',7' –diklorofloresin diasetat) hücre içine difüze olduktan sonra, hücre içinde deasetile formda floresana sahip değildir. Ancak ROS varlığında, boya DCF (2',7' – diklorofloresin) formuna oksitlenerek yoğun yeşil floresan yayar.

Kanser hücreleri 25000 hücre/kuyu olacak şekilde 24 kuyulu hücre kültür kabına ekildi. Ertesi gün, süpernatant aspire edildi ve bir kez PBS ile yıkandı. Hücreler 50 µg/ml konsantrasyonunda Karbon Dot ile 4 saat inkübe edildikten sonra kitten temin edilen 1X Solüsyon ile 2 kez yıkandı. Kuyulara 250 µl DCFDA eklenip 45 dk 37 $^{o}$C de boya internalizasyonu için inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler tekrar 1X Solüsyon ile 2 kez yıkandı ve fazla boya uzaklaştırıldı ve Karbon Dot içermeyen taze besiyeri eklendi. Standart PDT protokolü ile devam edilerek hücreler 520 nm dalga boyunda 1 saat irradiye edildi. Son basamakta, hücreler PBS ile yıkanıp 100 µl soğuk metanol ile -20 $^{o}$C' de 15 dk fikse edildi. Metanol aspire edildikten donra hücrelere DAPI çekirdek boyası eklenip, Floresan Mikroskobu'nda FITC kanalında görüntüleme yapıldı (Primover, Zeiss).

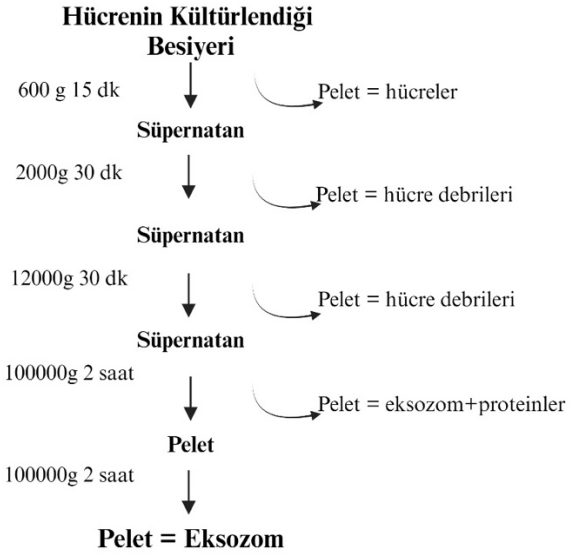
Fotodinamik Terapi kaynaklı hücresel döngüdeki değişikliği yorumlayabilmek için FxCycle PI/RNase işaretlemesi yapıldı (İnvitrogen, Kat. No.: F10797). Hücreler standard PDT uygulaması gerçekleştirildikten 4 saat sonra tripsin ile yüzeyden kaldırıldı. 500 g de 5 dk. Santrifüjlendikten sonra hücre peleti %70 lik soğuk etanol ile fikse edildi. Geceboyu + 4 $^{o}$C' de bekletildkten sonra, 12000 g 5 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Her grup için, 500 µl'şer PI/Rnase boyası tüplere eklenip 15 dk. Oda sıcaklığında inkübe edildi. Akış Sitometrisi cihazında 532 nm eksitasyonda 585 nm emisyonda ölçümleri yapıldı

## 2.4. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

### 2.4.1. Eksozom İzolasyonu

hpMKH' ler, T175 $cm^2$ hücre kültür kabında kültürlendi. Hücreler % 60-70 yoğunluğa ulaştığında besiyerleri aspire edilip DPBS ile 1 kez yıkandı. Chl-CD uygulanan gruplar için; hpMKH' ler 4 saat 200 µg/ml Chl-CD içeren tamamlanmış besiyeri ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 3 kez DPBS ile yıkanarak internalize olmayan malzemeler ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra her iki grup için de kültür kaplarına eksozom içermeyen-FBS ile tamamlanmış besiyeri eklenerek 48 saat normal kültür koşullarında inkübasyona devam edildi. 48 saatin sonunda besiyeri toplandı ve eksozom izolasyonu için seri santrifüjleme protokolüne geçildi (D. Wu vd., 2024).

İlk basamakta, ölü hücreleri ve debrileri uzaklaştırmak için süpernatant 600 g de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen süpernatant sırası ile 2000 g de 30 dk ve 12000 g 30 dk santrifüjlenerek büyük boyutlu mikroveziküller pelet olarak eksozomlardan ayrıldı. Toplanan süpernatant, eksozom izolasyonu için ultrasantrifüj tüplerine (Kat. No.; 355622, Beckman Coulter) aktarıldı ve 4 °C de 100000 g de 2 saat santrifüjlendi (Bekmann Coulter, Optima XL-100). Süpernatant dikkatlice aspire edildi ve peletler DPBS ile tek bir tüpte toplandı. Eksozomlar, serbest serum proteinlerini uzaklaştırmak için 4 °C de 100000 g de 2 saat tekrar santrifüjlendi. Elde edilen pelet 200 µl buzda soğutulmuş DPBS içinde kullanılacağı süreye kadar -80 °C de saklandı (Şekil 2.6.).




**Şekil 2.6**. Eksozom izolasyon basamakları

## 2.4.2. Eksozomların Total Protein Miktar Tayini

Eksozomların toplam protein miktarını tayin etmek için Pierce BCA Protein Assay Kit. (Kat. No.; 23225, Thermo Scientific) kullanıldı. Bu teknik; $Cu^{+2}$ iyonlarının proteinler tarafından $Cu^{+1}$ iyonuna indirgenmesi prensibine dayanır. BCA (Bikinçoninik Asit), $Cu^{+1}$ iyonları ile bir araya geldiğinde protein miktarıyla orantılı olarak güçlü absorbsiyon veren mavi-mor bir kompleks oluşturur.

Üreticinin belirttiği protokol takip edilerek kısaca; A ve B reaktiflerinden sırasıyla 50:1 oranda karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonu, 96 kuyulu kültür kabına kuyu başına 100 er µl olacak şekilde dağıtıldı. Çalışma solüsyonu içeren kuyulara, BSA (Sığır Serum Albümin) kullanılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki seri dilüsyonlar ve eksozom örneklerinden 5' er µl eklenerek hafifçe çalkalandı. Alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra 60 °C' de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaka okuyucu cihazında (Synergy HT, Bio-Tek) Gen 5 yazılımı ile 562 nm de absorbans okuması yapıldı.

Konsantrasyonları bilinen BSA standartlarının absorbans değerleri ile bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Bu eğrinin formülasyonu referans olarak kullanıldı ve eksozom örneklerinden ölçülen absorbans değerine karşılık gelen protein miktarı hesaplandı.

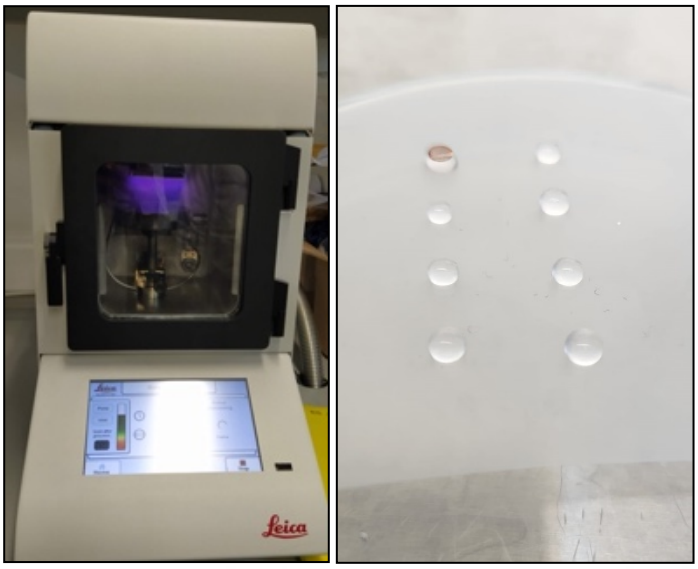
### 2.4.3. Eksozom Morfolojilerinin İncelenmesi

Eksozom morfolojilerini TEM' de görüntülemek için karbon kaplı nikel ızgaralar kullanıldı. TEM ızgaralarının hidrofilikliğini arttırmak için ızgaralar yükleme yapılmadan önce, Leica EM ACE 200 kaplama cihazında 30 sn 15 mA' de vakumlandı. DPBS içinde bulunan eksozomlardan 10 µl TEM ızgarasına damlatıldı ve oda sıcaklığında 20 dk. eksozomların ızgaraya absorbe olması beklendi. Bir petri kabının üzerine sarılan parafilme deiyonize su damlaları damlatıldı ve yüklü yüzey alta gelecek şekilde ızgaralar ters çevrilerek damlanın üzerine bırakıldı (Şekil 2.7.). 1 dakikalık yıkama süresinden sonra fazla su bir kâğıt yardımıyla emildi ve kontrastı sağlamak için su içinde hazırlanmış 5 µl % 1 lik Urasil Asetat ızgaranın eksozom yüklü yüzeyine damlatıldı. Izgaralar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ve mikroskop görüntülemeleri yapıldı.

Eksozom içeriğinde Bakır varlığının tespiti için EDX analizi gerçekleştirildi. Elemental analizlerde sinyal kontaminasyonunu minimalize etmek için eksozomlar, izolasyonunun son basamağında PBS yerine deiyonize su içinde toplandı. Herhangi bir fiksatif ya da kontrast boyama ajanı kullanılmadı. Nikel ızgaralara 10 µl eksozom örneği transfer edildikten sonra oda sıcaklığında 20 dk. kurutulmaya bırakıldı.

Eksozom içindeki Chl-CD' ların varlığı, alandaki Chl-CD kristal moleküler yapısının tespiti ile de onaylandı. Moleküler kristal yapıların görüntülenmesi için Yüksek Çözünürlük Transmisyon Elektron Mikroskobu (High-Resolution Transmission Electron Microscopy, HR-TEM) kullanıldı. HR-TEM örnekleri için de eksozomlar su içinde hazırlanıp nikel ızgaralara emdirildi. Olası sinyal kontaminasyonlarını elimine etmek için fiksatif ya da kontrast boyama ajanı kullanılmadı.

TEM, STEM, EDX ve HR-TEM analizleri Zaragoza Üniversitesi NFP Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.




**Şekil 2.7.** Eksozom yüklenen TEM ızgaralarının hazırlık aşaması

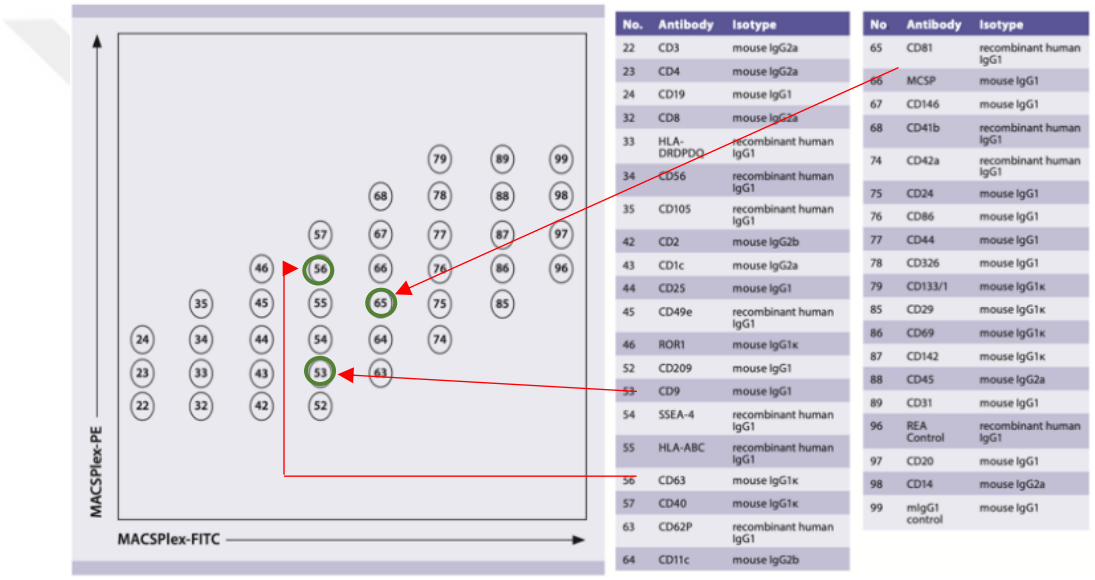
### 2.4.4. Eksozom Partikül Boyutu Dağılım Analizi

İzole edilen eksozomların boyut dağılımları ve partikül konsantrasyonunu belirlemek için Zaragoza Üniversitesi NFP Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) cihazı kullanıldı (NS300, Malvern Panalytical, UK). Cihazın çalışma prensibi; solüsyon içindeki her bir partikülün ışık saçılımı ve Brownian hareketini ayrı ayrı hesaplayarak hidrodinamik çaplarını hesaplamaya dayanır. Partiküller bir lazer kaynağı ile uyarılarak ışık saçılımına sebep olur ve partiküllerin hareketi bu saçılımlar sayesinde kaydedilir. Küçük boyutlu partiküller daha az ışık saçılımına sahiptir ve büyük parçacıklara göre daha hızlı hareket eder. Ölçüm, mutlaktır ve diğer nano seviyede partikül boyutu ölçen cihazlara kıyasla, kalibrasyon boncuklarına ihtiyaç duyulmaz (Gerritzen vd., 2017).

İzole edilen eksozomlar PBS içinde 1:100 oranda dilüe edilerek, kapiller borular yardımı ile cihaza yüklendi. Akış hızı sırasıyla 5, 20, 40, 60 µl/dakika olacak şekilde ayarlanarak eksozomlar kamera kayıt alanına kadar ilerletildi. Kayıt alınmaya başlandıktan sonra akış hızı 5 µl/dk da sabitlenerek 60 sn. de yaklaşık 1000 partikül ölçümü alındı.

### 2.4.5. Eksozom Belirteç İfadelerinin Analizi

Eksozom belirteçlerinin ifadesini analiz etmek için, MACSPlex EV Kiti (Kat. No.: 130.122.209) kullanıldı. Eksozomlarda bulunan 37 adet yüzey epitopu ve 2 adet kontrol izotip ile kaplanan lateks boncuklardan oluşur. Her lateks boncuk farklı floresan yoğunluğuna sahip olduğu için FITC ve PE kanallarında kapılandığında, farklı alanlarda popülasyonlar oluştururlar. Eksozomlar, bu lateks boncuklarla inkübe edildiklerinde, boncuk yüzeyine bağlanır. Eksozom varlığı, içinde APC-floresan konjugeli CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin bulunduğu kokteyl ile tespit edilir. Oluşan bu sandviç modeli, eksozom izolasyonu ve karakterizasyonunu mümkün kılar (Şekil 2.8.).




| No. | Antibody | Isotype |
|---|---|---|
| 22 | CD3 | mouse IgG2a |
| 23 | CD4 | mouse IgG2a |
| 24 | CD19 | mouse IgG1 |
| 32 | CD8 | mouse IgG2a |
| 33 | HLA-DRDPDQ | recombinant human IgG1 |
| 34 | CD56 | recombinant human IgG1 |
| 35 | CD105 | recombinant human IgG1 |
| 42 | CD2 | mouse IgG2b |
| 43 | CD1c | mouse IgG2a |
| 44 | CD25 | mouse IgG1 |
| 45 | CD49e | recombinant human IgG1 |
| 46 | ROR1 | mouse IgG1κ |
| 52 | CD209 | mouse IgG1 |
| 53 | CD9 | mouse IgG1 |
| 54 | SSEA-4 | recombinant human IgG1 |
| 55 | HLA-ABC | recombinant human IgG1 |
| 56 | CD63 | mouse IgG1κ |
| 57 | CD40 | mouse IgG1κ |
| 63 | CD62P | recombinant human IgG1 |
| 64 | CD11c | mouse IgG2b |

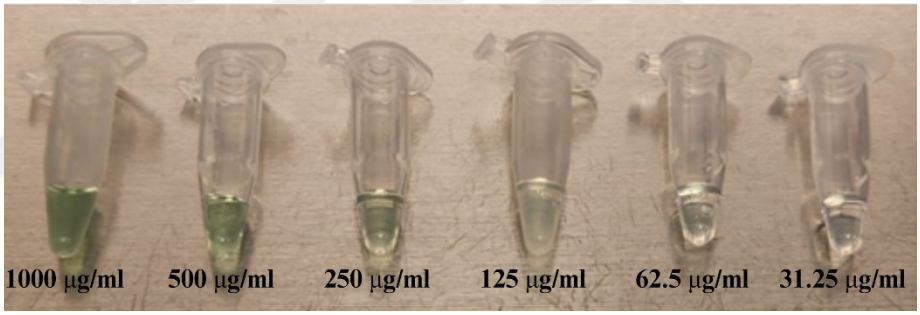
| No | Antibody | Isotype |
|---|---|---|
| 65 | CD81 | recombinant human IgG1 |
| 66 | MCSP | mouse IgG1 |
| 67 | CD146 | mouse IgG1 |
| 68 | CD41b | recombinant human IgG1 |
| 74 | CD42a | recombinant human IgG1 |
| 75 | CD24 | mouse IgG1 |
| 76 | CD86 | mouse IgG1 |
| 77 | CD44 | mouse IgG1 |
| 78 | CD326 | mouse IgG1 |
| 79 | CD133/1 | mouse IgG1κ |
| 85 | CD29 | mouse IgG1κ |
| 86 | CD69 | mouse IgG1κ |
| 87 | CD142 | mouse IgG1κ |
| 88 | CD45 | mouse IgG2a |
| 89 | CD31 | mouse IgG1 |
| 96 | REA Control | recombinant human IgG1 |
| 97 | CD20 | mouse IgG1 |
| 98 | CD14 | mouse IgG2a |
| 99 | mIgG1 control | mouse IgG1 |

**Şekil 2.8**. MACSPlex eksozom karakterizasyon kitinin çalışma prensibi.

Kit protokolünü takip ederek kısaca; 1,5 ml lik ependorf tüpler içinde 500 µl kit solüsyonuna 15 µl lateks boncuk ve 120 µl eksozom eklenerek gece boyu inkübe edildi. Karışım 3000 g 5 dk. santrifüjlenip, süpernatan dikkatlice aspire edildi. Pelet halindeki boncuklara bağlanmış eksozomlar 500 µl kit solüsyonunda süspanse edildi ve içine 15 µl CD9, CD63 ve CD81 antikor kokteyli eklendi. Karışım, 450 rpm hızda orbital döngülü bir karıştırıcıda 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda 3000 g de 5 dk. santrifüjleme yapılarak solüsyon uzaklaştırıldı. Eksozomlar 500 µl kit solüsyonunda süspanse edilerek Akış Sitometrisinde okutuldu.

### 2.4.6. Eksozomların Chl-CD Yüklenme Kapasitesinin Hesaplanması

PL Spektrofotometre analizinde Chl-CD' ların 400 nm de spesifik bir absorbansa sahip olduğu gözlenmiştir. Bu karakteristik absorbans değerinden faydalanarak, eksozomlara yüklenen Chl-CD miktarını hesaplamak mümkündür. Bunun için; PBS içinde hazırlanan serbest Chl-CD seri dilüsyonları (0-1000 µg/ml), 100 er µl 96 kuyulu kültür kaplarına dağıtıldı ve spektrometre cihazında 400 nm de absorbans ölçümü yapılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Zhu vd., 2022), (Z. Chen vd., 2024). İzole edilen $EXO_{MKH}$ ve $CD@EXO_{MKH}$' ların BCA ölçümleri ve ardından 96 kuyulu kültür kaplarında absorbans ölçümleri yapıldı. Spektral olarak yapılan ölçümlerde kontrol grubu boş eksozomlarda ($EXO_{MKH}$) ve Chl-CD taşıyan eksozomlarda ($CD@EXO_{MKH}$) 400 nm' de karakteristik absorbans varlığı değerlendirildi. Chl-CD taşıyan eksozomlardan alınan absorbans değeri, Chl-CD standard kalibrasyon eğri formülü üzerinden, Chl-CD miktarını hesaplamak için kullanıldı. Eksozom µg'ının başına düşen Chl-CD miktarı hesaplandı.




**Şekil 2.9.** PBS içinde hazırlanan Chl-CD seri dilüsyonları

## 2.5. Eksozom Aracılı PDT Yanıtının Değerlendirilmesi

### 2.5.1. Eksozomların Kanser Hücresine İnternalizasyonu

U87, A549 ve U251 hücre hatları 12 kuyulu hücre kültür kabına 150 000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Yüzeye tutunmaları için 24 saat beklendikten sonra, süpernatant aspire edilip bir kez PBS ile yıkandı. İlgili kuyulara 5 μg/ml $EXO_{MKH}$ veya $CD@EXO_{MKH}$ içeren tamamlanmış besiyeri eklenerek hücreler 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, süpernatant aspire edildi ve hücreler 3 kez PBS ile yıkanarak internalize olmayan eksozomlar ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 200 μl/kuyu tripsin ile 2 dakika 37 ºC de inkübe edildikten sonra yüzeyden kalkan hücreler, 1' er ml tamamlanmış besiyeri ile mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler, 300 g de 4 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp, hücre peleti 200 μl PBS ile süspanse hale getirildi ve Novocyte Akış Sitometri cihazında 50 000 okuma olacak şekilde okutuldu(Escrevente vd., 2011).

### 2.5.2. Eksozom Aracılı PDT Uygulaması

Fotodinamik terapi çalışma dozunu belirlemek için öncelikle sitotoksik olmayan eksozom dozunu belirlendi. Kanser hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat normal koşullar altında inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri aspire edildikten sonra 100 μl içinde hazırlanan farklı dozlarda eksozom (2.5, 5 ve 10 μg/ml), kanser hücrelerine uygulandı ve 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücre canlılığı LDH analizi ile değerlendirildi.

Toksik olmayan doz belirlendikten sonra, kanser hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına ekildi ve 24 saat sonra belirlenen dozda (5 μg/ml) eksozom uygulandı. Serbest Chl-CD uygulaması ile aynı protokol takip edilerek 4 saat inkübasyon sonunda hücreler 1 saat 520 nm ışık ile uyarıldı. PDT uygulamasını takip eden 18 saat içinde hücrelerde LDH kiti ile hücre canlılığı değerlendirildi.

## 2.6. *İn Vivo* Fotodinamik Terapi Çalışmaları

Hayvan deneylerinde, serbest Chl-CD biyodağılımı için 6 haftalık Balb/c fareler, eksozom aracılı biyodağılım incelemesi için ortotopik kanser modellenmiş Balb-c nude fareler kullanıldı. Biyodağılım görüntülemeleri için serbest Chl-CD' lu gruplara, 250 µg/ 100 µl ve 500 µg/ 100 µl olmak üzere 2 farklı dozda, eksozomlu gruplara ise 40 µg/ 100 µl konsantrasyonda kuyruk veninden uygulama yapıldı. Biyodağılım görüntülemeleri uygulamadan 24 saat sonra IVIS (Perkin Elmer) cihazında gerçekleştirildi.

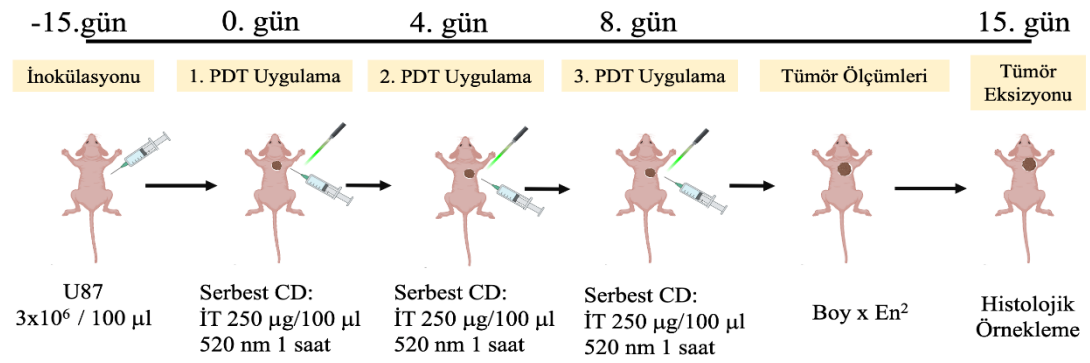
Ortotopik kanser modeli için; Balb-c nude farelere 3 x $10^6$ U87 kanser hücresi 1:1 oranda soğuk matrijel:PBS içinde subkutan olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan yaklaşık 15 gün sonra tümör hacimleri (boy x $en^2$) hesaplandı. Toplam ortalama hacimleri istatistiksel olarak anlamlı olmayan 5' erli hayvan grupları, rasgele olarak oluşturuldu.

Serbest CD PDT uygulaması için 3' er gün arayla 250 µg/ 100 µl Chl-CD, intratümöral olarak uygulandı ve enjeksiyondan 1 saat sonra 1 saatlik 520 nm ışık irradiyasyonu gerçekleştirildi (Şekil 2.10. A). Eksozom aracılı PDT uygulamasında ise; kuyruk veninden 40 µg/ 100 µl eksozom enjekte edildi. Uygulamadan 24 saat sonra, ışık gruplarına 1 saat 520 nm LED ışık uygulandı (Çizelge 2.10. B).

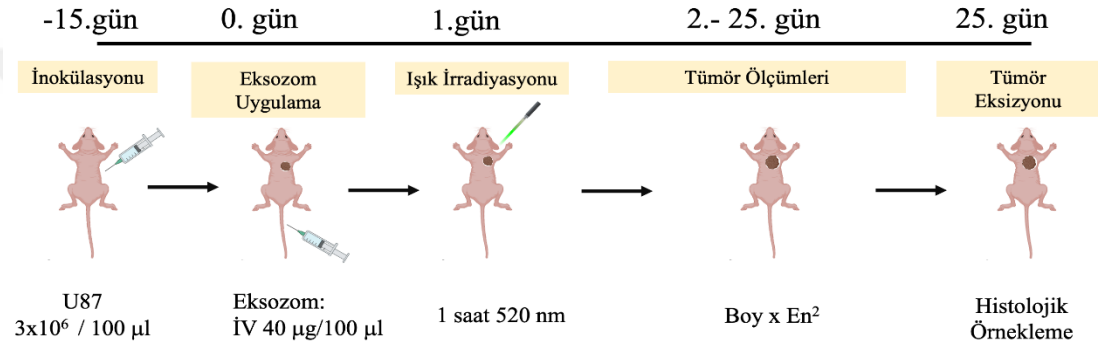
Tümör büyüklükleri ve hayvanların sağlık durumları her 3-4 günde bir takip edildi. Kontrol tümörlerinde nekroz oluşumu gözlenmeye başlandığında deney sonlandırıldı. Hayvanlar, servikal dislokasyon ile sakrifiye edilip, organlar histolojik incelemeler için % 10 nötral tamponlanmış formalin solüsyonunda 72 saat tespit edildi. Parafin bloklara gömülen örneklerden, mikrotom ile 5 µm' lik seri kesitler alındı ve standard hematoksilen-eozin/Masson-Goldner boyamaları yapıldı.

Tüm hayvan deneyleri, Bilkent Üniversitesi Etik Kurul Kararı (Tarih: 13.05.2024, Toplantı No: 5, Dosya No: 10, Karar No: 2024/10) onayı ile Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

**A.**




**B.**



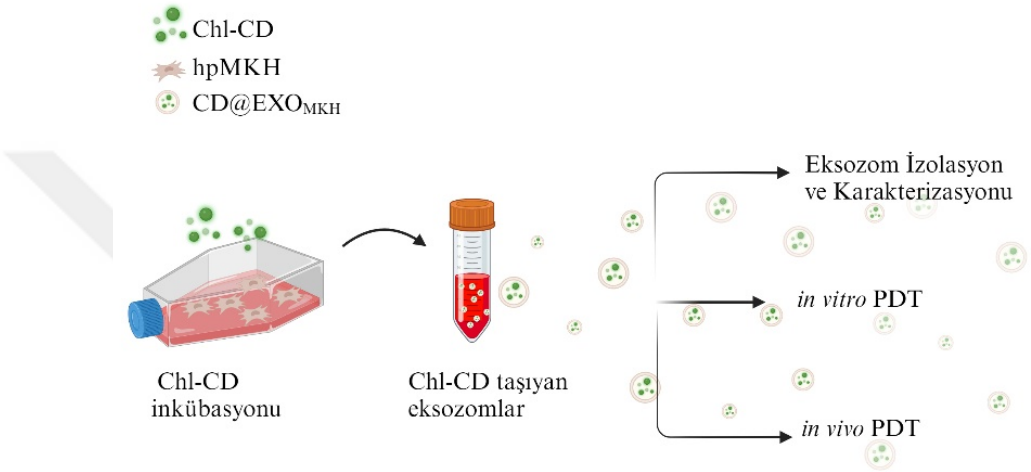

**Şekil 2.10**. *İn vivo* deney akış şeması: A. Serbest Chl-CD aracılı-PDT B. Eksozom aracılı-PDT.

**Çizelge 2.1.** İn vivo deney grupları.

| No | Serbest Chl-CD ile PDT | No | Eksozom aracılı PDT |
|---|---|---|---|
| **1** | Kontrol | **1** | Kontrol |
| **2** | CD<br>(Chl-CD uygulanan grup) | **2** | $EXO_{MKH}$<br>(Boş eksozom uygulanan grup) |
| **3** | CD + L<br>(Chl-CD + Işık uygulanan grup) | **3** | $CD@EXO_{MKH}$<br>(Chl-CD taşıyan eksozom uygulanan grup) |
| | | **4** | $EXO_{MKH}$ + L<br>(Boş eksozom ve ışık uygulanan grup) |
| | | **5** | $CD@EXO_{MKH}$ + L<br>(Chl-CD taşıyan eksozom ve ışık uygulanan grup) |

## 2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için; GraphPad Prism 8 versiyon 8.4.3.(471) programı kullanıldı. 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizleri için; $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi (0,1234 (ns); 0,0332 (*); 0,0021 (**); 0,0002 (***); <0.0001 (****)). Deneyler, en az üçer teknik ve üçer biyolojik tekrar ile gerçekleştirilmiştir.



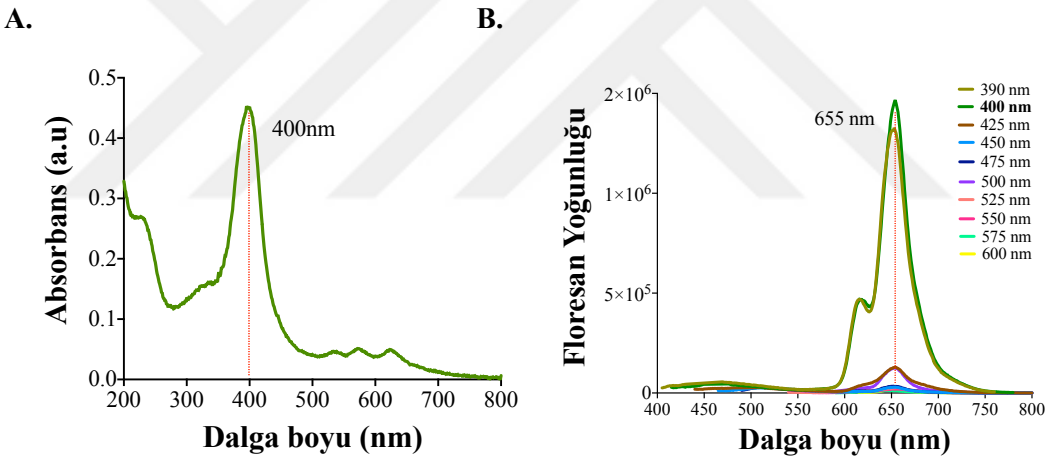

**Şekil 2.11**. Tez Akış Şeması.

# 3. BULGULAR

## 3.1. Karbon Dot Karakterizasyonu

### 3.1.1. UV-VİS ve PL Spektroskopileri

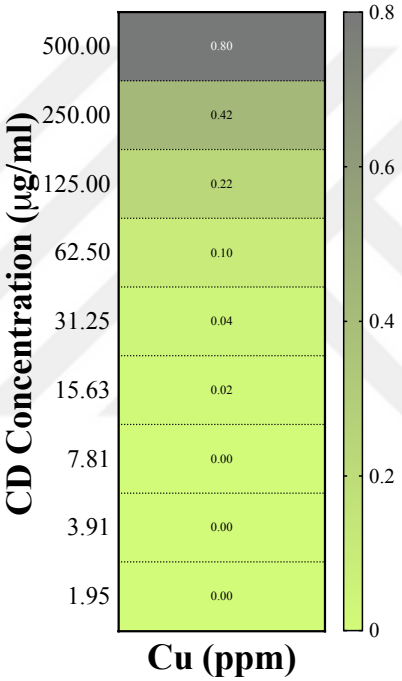
Karbon Dot'ların optik özelliklerini tanımlayabilmek için UV-VIS ve PL Spektroskopi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. UV-VIS ölçümlerine göre; Chl-CD' ların 400 nm' de karakteristik bir pik verdiği gözlenmiştir (Şekil 3.1. A). Bu pik değeri klorofil kaynaklı porfirin halkasına atfedilmektedir (Kirbas Cilingir vd., 2024). Farklı dalga boylarında yapılan eksitasyonlara karşı hangi dalga boyunda emisyon verdiğini analiz etmek için PL Spektroskopi ölçümü yapılmıştır. Şekil 3.1. B'de de görüldüğü üzere; maksimum emisyon yoğunluğu, 400 nm eksitasyonda, 655 nm kırmızı alanda kaydedilmiştir.




**Şekil 3.1.** Chl-CD' ların optik özellikleri: A. Absorbans değerlerinin UV-Vis' de ölçümü, B. Eksitasyon ve emisyon değerlerinin PL Spektroskopisi'nde ölçümü.

### 3.1.2. MP-AES

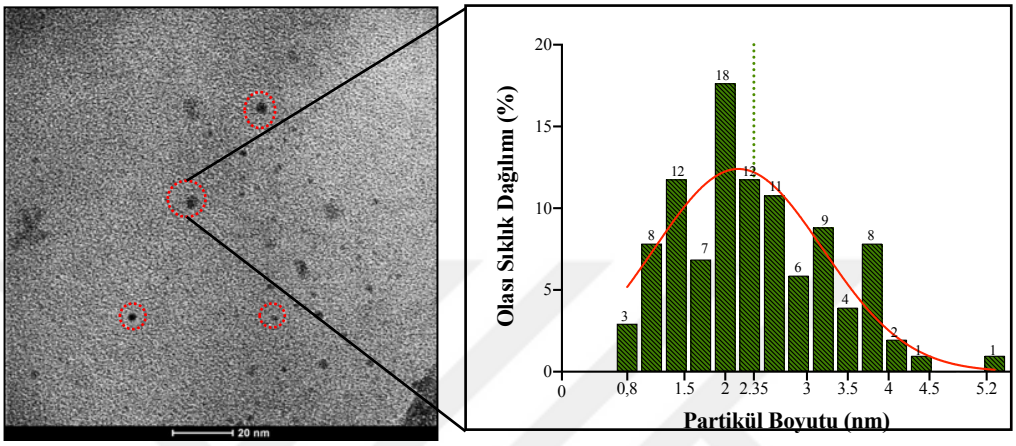
Tez çalışmasında kullanılan Chl-CD' lar, Klorofilin Sodyum Bakır tuzundan sentezlenmiştir. Klorofilden kaynak alan Bakır elementinin Chl-CD sentezi esnasında korunduğu ve Chl-CD'ların moleküler yapısına dahil olabileceği varsayılarak elemental ölçümü gerçekleştirilmiştir. Metalik bir element olan Bakır'ın Chl-CD' lardaki varlığı MP-AES ölçümü ile tespit edilmiştir. Şekil 3.2.'de; Chl-CD konsantrasyonu arttıkça, Bakır varlığının da arttığı gözlenmektedir. MP-AES ölçümüne göre; 500 µg/ml Chl-CD solüsyonunda 0, 80 ppm yani 0,80 µg/ml Bakır bulunmaktadır.




**Şekil 3.2.** Chl-CD içerik analizi: MP-AES ile Bakır elementinin miktar ölçümü.

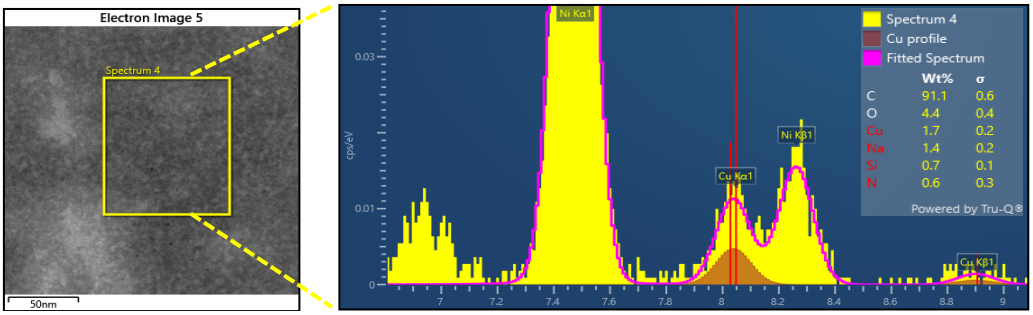
### 3.1.3. TEM, STEM ve HR-TEM

Karbon Dot' ların morfolojisi TEM ile görselleştirilmiş olup, küresel bir yapıya sahip oldukları gözlemlenmiştir. Sıklık dağılım analizine göre, partiküllerin ortalama boyutu 2,35 ± 0,91 nm olarak hesaplanmıştır (n>100) (Şekil 3.3).



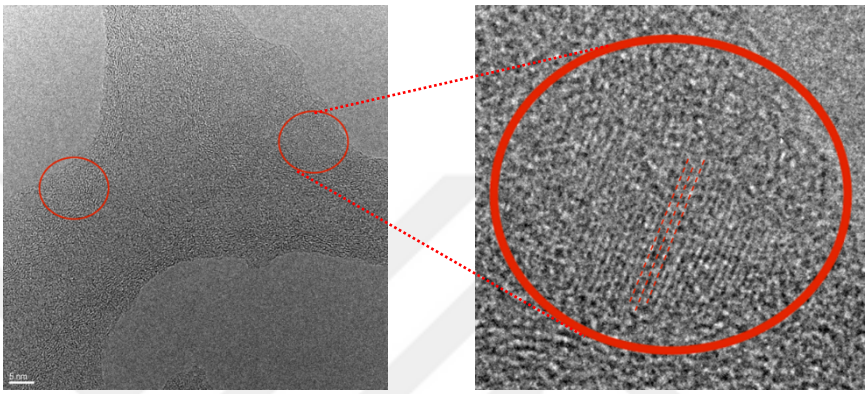

**Şekil 3.3.** Chl-CD' ların morfolojik yapısı: TEM görüntüsü ve boyut dağılımı

Karbon Dot' lardaki Bakır varlığı STEM-EDX analizi ile kontrol edilerek MP-AES ölçümleri doğrulanmıştır. Karbon Dot' ların yayılım gösterdiği ızgara alanında Bakır elementine ait sinyaller kaydedilmiştir. Spektrum 4 için yapılan EDX ölçümüne göre; Bakır elementinin, alanın yaklaşık % 1.7' si kadar olduğu görülmektedir (Şekil 3.4.).




**Şekil 3.4.** Chl-CD' ların elemental analizi: STEM görüntüsü ve Bakır sinyallerinin EDX analizi.

Karbon Dot' ların kristal yapısı HR-TEM'de değerlendirilmiştir. Karbon Dot' un yapı iskeletini oluşturan Karbon atomları, düzenli grafit benzeri katmanlar şeklinde konumlanır. Her katman arasındaki mesafe, nanomalzemenin karakteristik özelliklerini etkiler. Karbon nanomalzemelerin boyutları küçüldükçe bu katmanların düzenliliği artar. Karbon Dot' lar için bu mesafe yaklaşık olarak 0,21 – 0,24 nm civarındadır. Amorf yapıdaki nanomalzemeler için bu katmanlar düzensiz olarak yerleşir (Etefa vd., 2024) . Şekil 3.5.' de Chl-CD' lara ait düzenli yerleşim gösteren Kafes Boşlukları (Lattice space) görülmektedir.

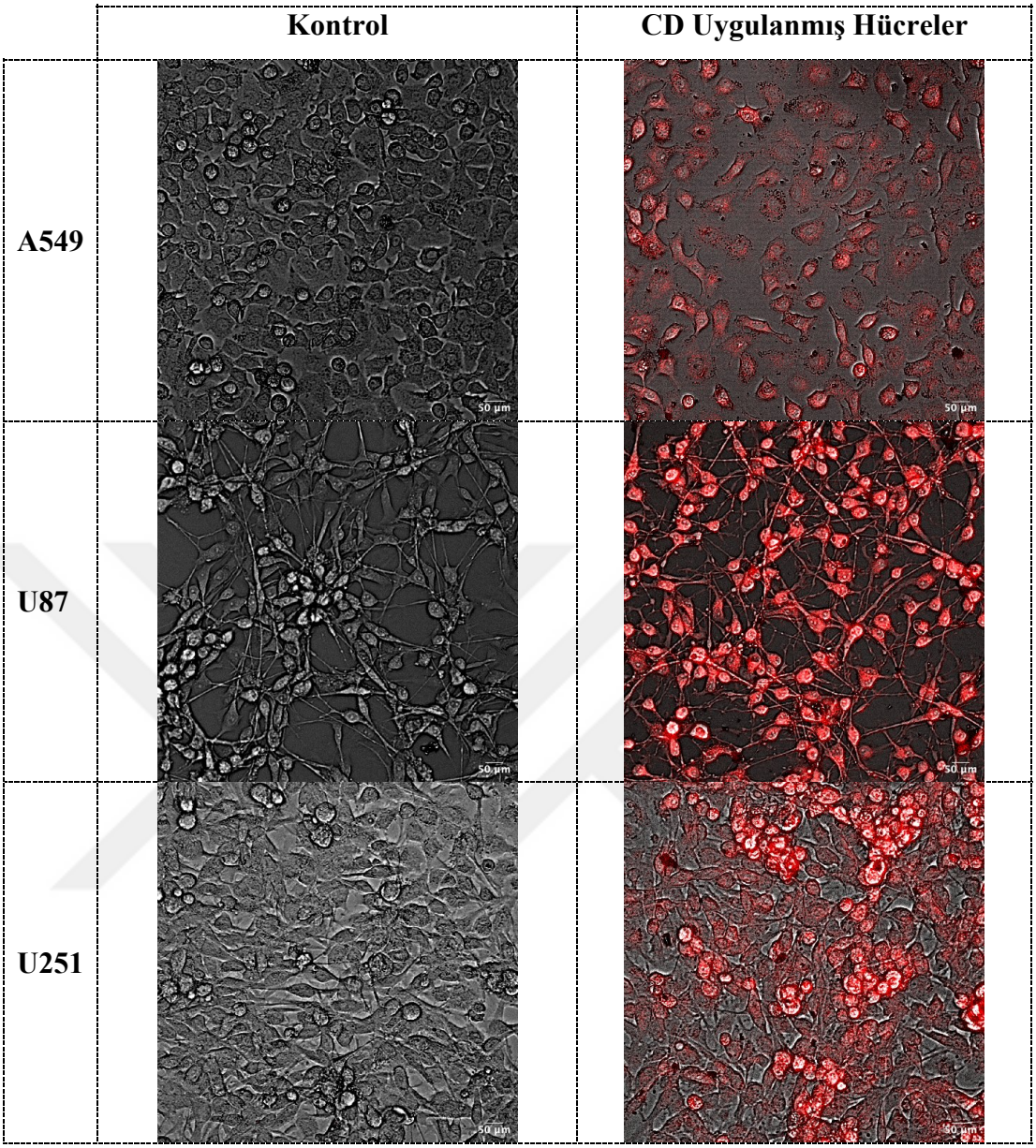


**Şekil 3.5**. Chl-CD' ların kristalin yapısı: HR-TEM görüntüsü ve kafes boşlukları.

## 3.2. Karbon Dot İnternalizasyonunun Değerlendirilmesi

### 3.2.1. Konfokal Mikroskop

Kanser hücre hatları, 200 µg/ml Chl-CD ile 4 saat inkübe edilerek konfokal mikroskobunda görüntülenmiştir. Karbon Dot' ların intrinsik floresan özelliğinden faydalanmak üzere hücreler, 400 nm'de uyarılmış ve 600-700 nm aralığında emisyon sinyalleri toplanmıştır. Uygulama yapılan kanser hücre grupları, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kırmızı floresan görüntüsü kaydedilmektedir (Şekil 3.6.).

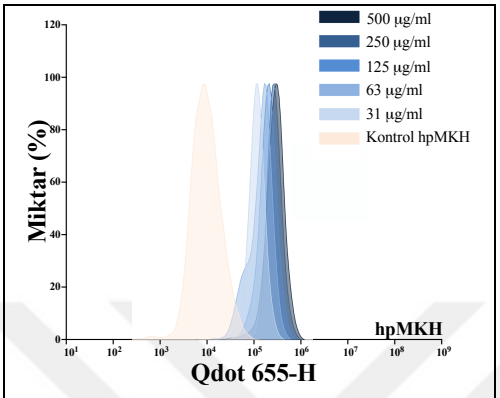



**Şekil 3.6**. Chl-CD internalizasyonu: Kanser hücreleri, cam tabanlı hücre kültür kaplarına 300.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, 100 ug/ml Chl-CD ile 4 saat inkübe edildikten sonra, Fenol Kırmızısı içermeyen besiyerinde canlı olarak, Konfokal Mikroskobu ile görüntülenmiştir (Ölçek çizgisi 50 µm).

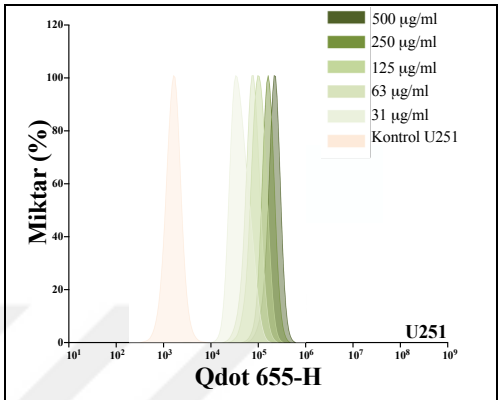
### 3.2.2. Akış Sitometri

Hücresel internalizasyonu değerlendirmek ve konfokal sonuçlarını desteklemek için Chl-CD ile inkübe edilen hücreler, Akış Sitometrisi' nde analiz edilmiştir. Ölçümler, mavi lazer uyarımında, Qdot655 kırmızı filtre üzerinden yapılmıştır. Hücreler, birbirleri arasında

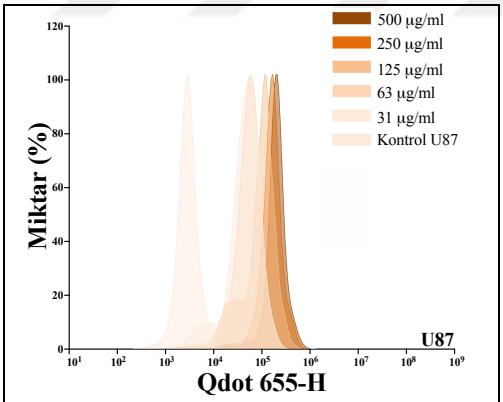
karşılaştırıldığında hpMKH' lerin kanser hücrelerine göre yaklaşık 4,4 kat daha fazla bazal floresan verdiği kaydedilmiştir. Artan konsantrasyonlarda Chl-CD ile muamele edilen tüm hücre gruplarında konsantrasyona bağlı olarak floresan yoğunluğunda artış gözlenmektedir (Şekil 3.7.).



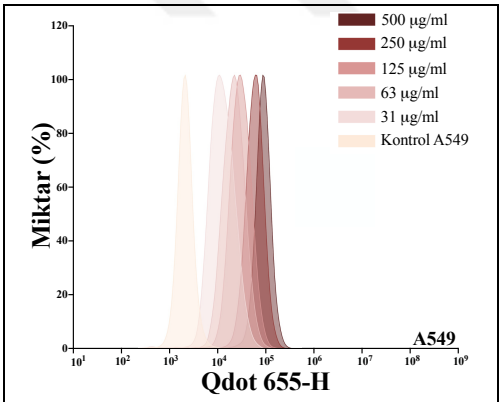

| CD Kons. | Ort. Flor. Yoğ. | Stand. Sap. |
|---|---|---|
| 500 µg/ml | 237,9275 | 8,18 |
| 250 µg/ml | 216,1975 | 9,82 |
| 125 µg/ml | 164,946 | 5,82 |
| 63 µg/ml | 125,2625 | 1,32 |
| 31 µg/ml | 100,3155 | 3,80 |
| Kontrol | 11,3215 | 1,96 |




| CD Kons. | Ort. Flor. Yoğ. | Stand. Sap. |
|---|---|---|
| 500 µg/ml | 221,934 | 3,69 |
| 250 µg/ml | 173,125 | 4,85 |
| 125 µg/ml | 110,145 | 4,39 |
| 63 µg/ml | 82,226 | 3,18 |
| 31 µg/ml | 49,206 | 1,44 |
| Kontrol | 1,765 | 0,09 |



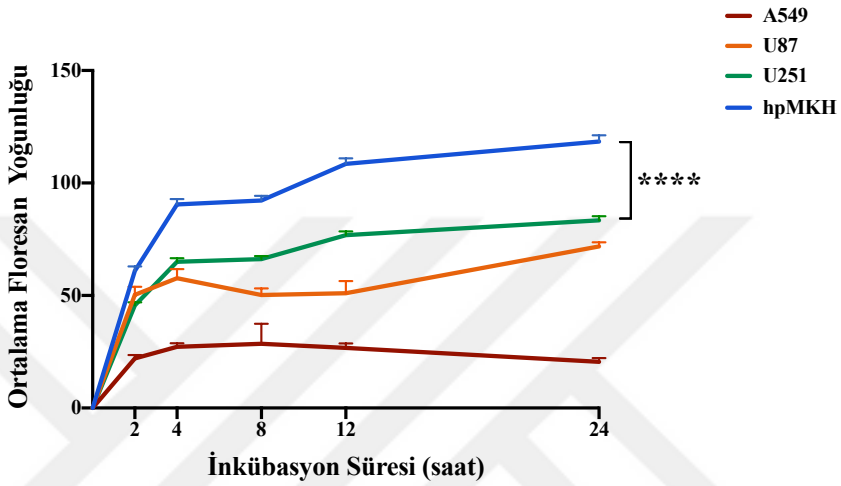

| CD Kons. | Ort. Flor. Yoğ. | Stand. Sap. |
|---|---|---|
| 500 µg/ml | 197,387 | 9,62 |
| 250 µg/ml | 160,663 | 9,17 |
| 125 µg/ml | 102,6665 | 3,76 |
| 63 µg/ml | 58,4785 | 4,39 |
| 31 µg/ml | 49,987 | 2,67 |
| Kontrol | 3,3225 | 0,25 |




| CD Kons. | Ort. Flor. Yoğ. | Stand. Sap. |
|---|---|---|
| 500 µg/ml | 114,7835 | 4,16 |
| 250 µg/ml | 77,7745 | 3,99 |
| 125 µg/ml | 39,6855 | 3,49 |
| 63 µg/ml | 28,6875 | 2,68 |
| 31 µg/ml | 16,3075 | 2,24 |
| Kontrol | 2,639 | 0,20 |

**Şekil 3.7.** Farklı konsantrasyonlardaki Chl-CD internalizasyonu: Hücreler, 150.000 hücre/ kuyu olacak şekilde 12 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda Chl-CD ile inkübe edilmiştir. 4 saat inkübasyonun ardından internalizasyon, Akış Sitometrisi ile değerlendirilmiştir.

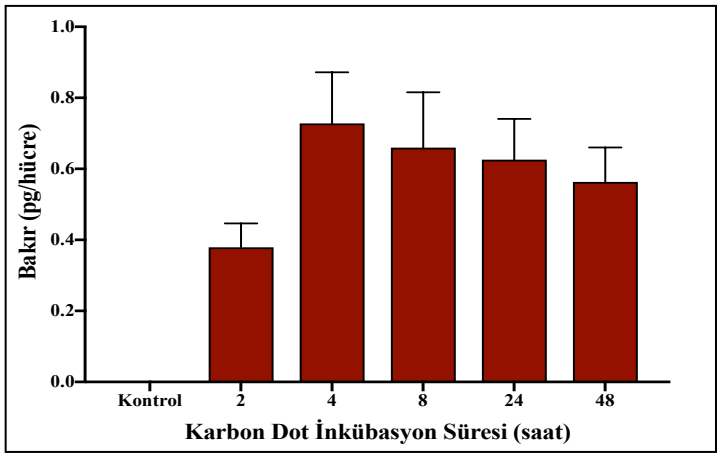
Farklı inkübasyon sürelerinde, 50 µg/ml konsantrasyonda Chl-CD uygulanmış hücreler Akış Sitometrisi'nde analiz edilmiştir. Her 4 farklı grup hücre popülasyonunda da yaklaşık 4 saatlik inkübasyonun sonunda maksimum internalizasyonun gerçekleştiği ve floresan yoğunluğunun bu süreden sonra plato evresine geçtiği gözlenmektedir. Bunun yanı sıra; kanser hücre tipleri ile kıyaslandığında hpMKH' lerinin yaklaşık 1,8 kat daha fazla Chl-CD internalizasyonu gerçekleştirdiği dikkat çekmektedir (Şekil 3.8.).




**Şekil 3.8.** Farklı inkübasyon sürelerinde Chl-CD İnternalizasyonu: Hücreler, 150.000 hücre/ kuyu olacak şekilde 12 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, 50 µg/ml Chl-CD ile farklı sürelerde inkübe edilmiştir. İnternalizasyon, Akış Sitometrisi' nde değerlendirilmiştir. (hpMKH ve U251 hücrelerinin floresan yoğunlukları 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. ****, $p < 0.0001$)

### 3.2.3. ICP-MS

İnternalizasyon değerlendirmesi; konfokal görüntüleme ve floresan yoğunluğunun ölçülmesi dışında, nanomalzeme içeriğindeki metal elementinin takibi ile de mümkündür. Farklı internalizasyon sürelerinde Chl-CD uygulanan hpMKH' ler, hücrelerdeki bakır miktarlarının ölçülmesi için, ICP-MS ile analiz edilmiştir. Şekil 3.9.'da Bakır yoğunluğunun, inkübasyonun dördüncü saatinde maksimum noktaya ulaştığı ve daha sonra plato aşamasına girdiği görülmektedir.

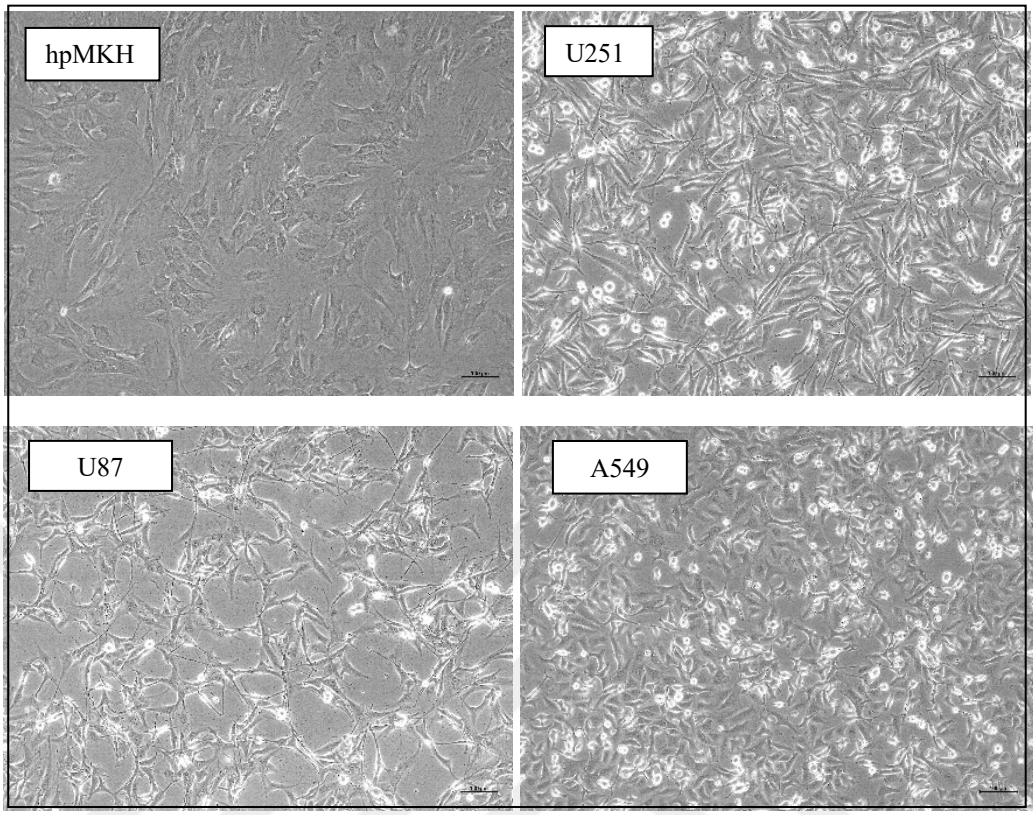



**Şekil 3.9.** Chl-CD kaynaklı Bakır internalizasyonu: Farklı inkübasyon sürelerinde 250 µg/ml Chl-CD ile inkübe edilen hpMKH hücre peletleri aqua regia ile sindirildikten sonra, Bakır varlığı üzerinden Chl-CD internalizasyonu değerlendirilmiştir. Bakır miktarı, ICP-MS ile değerlendirilmiştir.

## 3.3. *In Vitro* PDT Çalışmaları

### 3.3.1. Hücre Kültürü

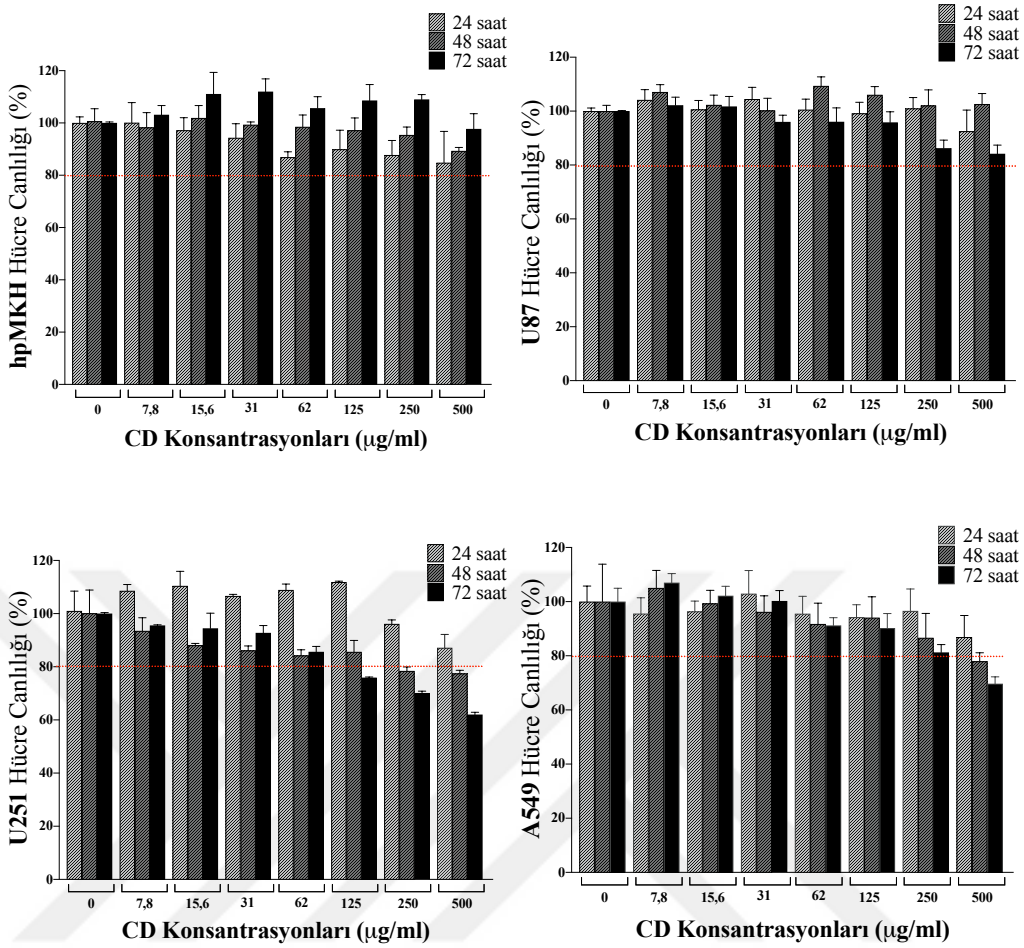
Hücreler standard kültür koşulları altında kültürlenmiştir. Eksozom izolasyonunda kullanılan hpMKH' ler için pasaj numarası en fazla P5' e kadar kullanılmıştır. Eksozom izolasyonu için kullanılacak hpMKH' lerin kültür kabındaki hücre yoğunluğu % 70-80 seviyesindeyken, Chl-CD inkübasyonu başlatılmıştır. A549, U87, U251 kanser hücreleri için pasaj numaraları sırası ile P24, P18 ve P14' e kadar kullanılmıştır. Şekil 3.10.'da kültür ortamındaki sağlıklı hücrelerin morfoloji görüntüleri yer almaktadır.




**Şekil 3.10.** Sağlıklı hücre morfolojileri: hpMKH, U251, U87 ve A459 hücrelerinin Ters Mikroskop görüntüleri (Ölçek çizgisi 100 μm).

### 3.3.2. Karbon Dot' ların Hücre Canlılığına Etkisi

Farklı konsantrasyonlar ve uzun inkübasyon sürelerinde Chl-CD' ların sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Şekil 3.11.'de; 24 saatlik inkübasyon boyunca yüksek konsantrasyonlarda dahi hücre canlılığında anlamlı bir düşüş olmadığı görülmektedir. U251 kanser hattında 48 saatten sonra yüksek konsantrasyonlarda canlılığın % 80' lerin altına düşülmeye başlandığı, fakat bunun aksine, hpMKH' lerde 72 nci saatte dahi herhangi bir toksisitenin görülmediği dikkat çekmektedir.

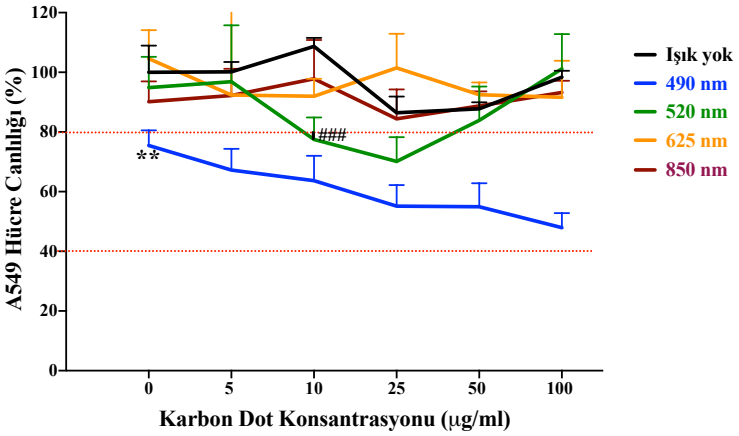



**Şekil 3.11**. Chl-CD' ların hücre canlılığına etkisi: Hücreler 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kabına ekildiken sonra farklı konsantrasyonlarda (500-0 μg/ml) Chl-CD ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı LDH ile değerlendirilmiştir.

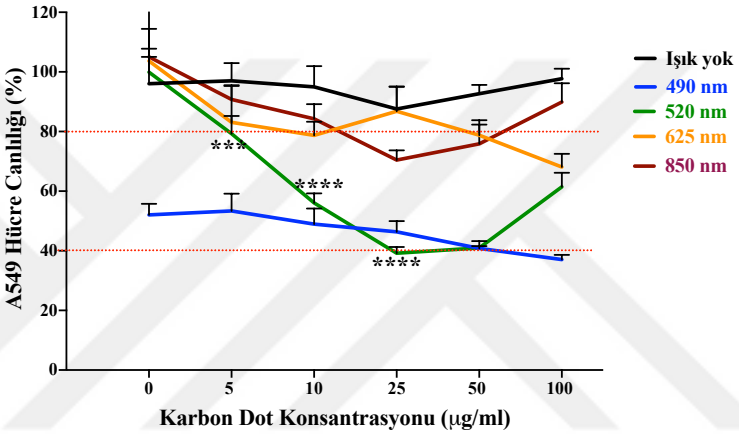
### 3.3.3. Karbon Dot'ların Fotodinamik Terapi Etkisi

Karbon Dot' ların PDT etkisini değerlendirmek amacıyla farklı konsantrasyonlar, dalga boyları ve ışık uyarım süreleri test edilmiştir. Chl-CD' lar ile inkübe edilen A549 hücrelerine 30 dakikalık ışık uygulandığında, test edilen dalga boylarında yeterli hücre ölümü gözlemlenmemiştir (Şekil 3.12. B). 490 nm dalga boyundaki ışık uygulamasının, malzeme uygulanmayan kontrol grubundaki hücrelerde hücre canlılığını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Öte yandan, 520 nm dalga boyunda 1 saat boyunca ışınlanan hücrelerde hücre canlılığının % 40' lara kadar düştüğü belirlenmiştir (Şekil 3.12. B). Chl-CD'lerin 520 nm dalga boyunda aktive olduğu ve 5 μg/ml konsantrasyonunda dahi kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde hücre ölümüne neden olduğu gözlenmiştir.

A.

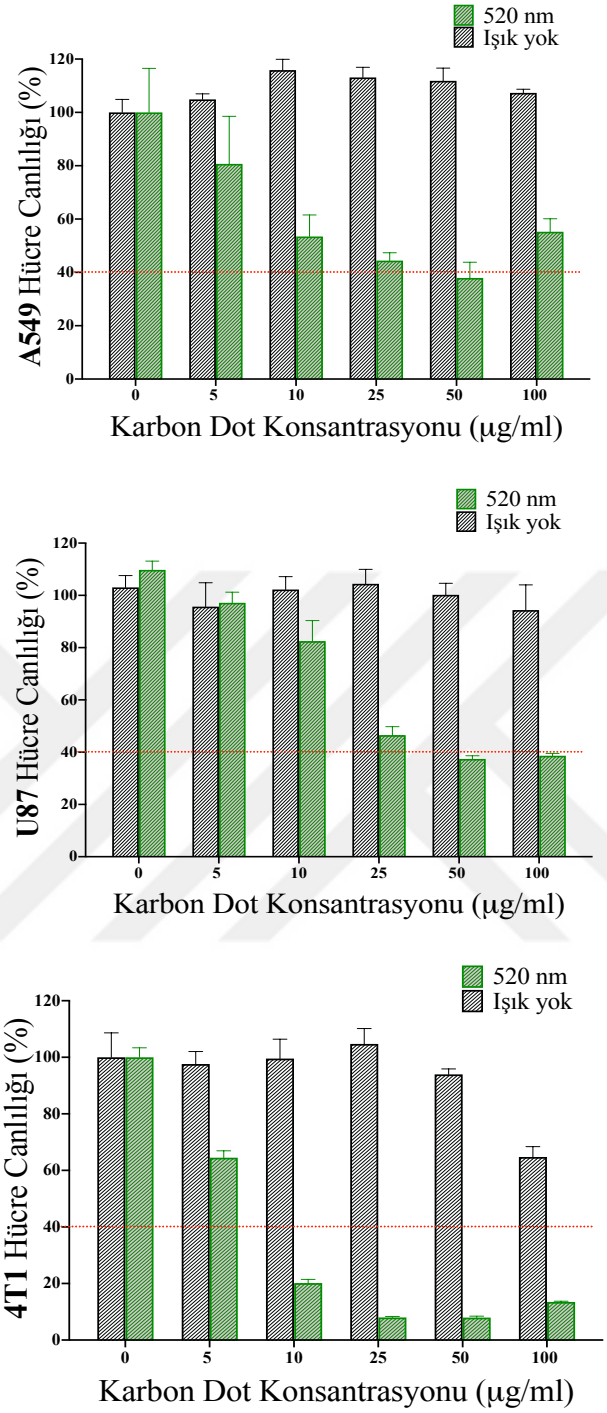



B.




**Şekil 3.12.** PDT optimizasyonu: A549 hücreleri, 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Chl-CD' lar ile inkübe edildikten 4 saat sonra, farklı dalga boyundaki ışık ile irradiye edilmiştir. Hücre canlılıkları LDH ile değerlendirilmiştir. A. 30 dakika ışık uygulaması B. 1 saat ışık uygulaması. (Gruplar, ışıksız kontrol grubuna göre, 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. **, $p< 0.002$; ***, $p< 0.0002$; ****, $p< 0.0001$; ###, $p< 0.0002$).

Chl-CD' ların PDT etkisi farklı kanser hücre hatlarında da test edilmiştir. A549, 4T1 ve U87 hücre hatlarına farklı konsantrasyonlarda Chl-CD uygulaması yapılmış ve 520 nm' de 1saat uyarılmıştır. Şekil 3.13. 'de hücre canlılığının, insan kaynaklı kanser hatlarında (A549 ve U87) 50 µg/ml konsantrasyonda % 40'a, 4T1 hücre hattında ise 10 µg/ml konsantrasyonda % 20' nin altına düştüğü görülmektedir.



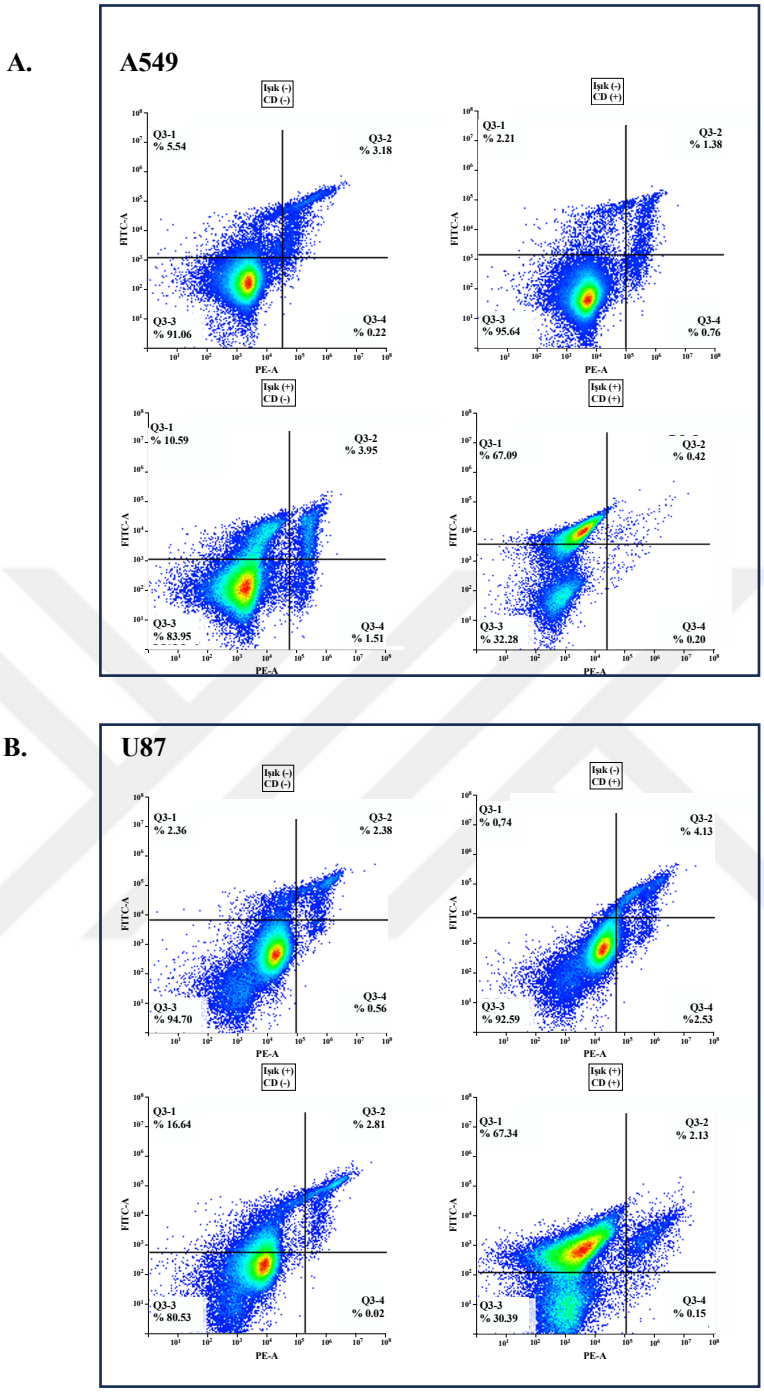

**Şekil 3.13**. Farklı hücre hatlarında PDT yanıtının değerlendirilmesi: A549, U87 ve 4T1 hücreleri farklı konsantrasyonlardaki Chl-CD ile inkübe edildikten sonra 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. Hücre canlılıkları LDH ile değerlendirilmiştir.

### 3.3.4. Apoptoz, Hücre Döngüsü ve ROS oluşumu

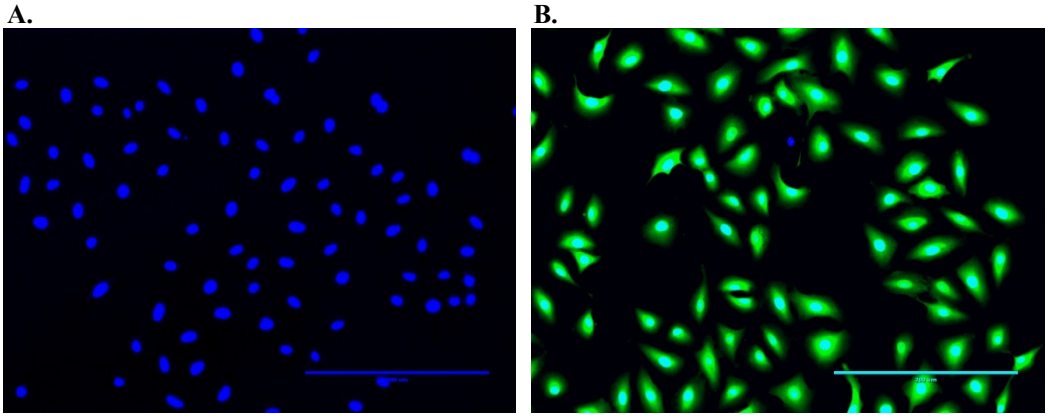
PDT uygulamasını takip eden hücre ölümünün programlı bir hücre ölümü olup olmadığını analiz etmek için Anneksin V ve PI işaretlemeleri yapılmıştır. Sırayla; A549 hücrelerinde % 67.09 ve U87 hücrelerinde % 67.34 oranında erken evre apoptoz tespit edilmiştir. Şekil 3.14. A ve B 'de her iki hücre grubunda gözlenen hücre ölümünün sadece ışık ya da sadece Chl-CD' kaynaklı olmadığı, malzeme ve ışık kombinasyonunun birlikte çalıştığı (ışık +, CD +) görülmektedir.

U87 hücrelerinde PDT uygulamasını takip eden ROS oluşumu, floresan boyama ile tespit edilmiştir. Şekil 3.15.'de Chl-CD ve ışık kombinasyonunun olduğu gruplarda sitoplazmaya yayılan ROS kaynaklı yeşil floresan ışıma görülmektedir.

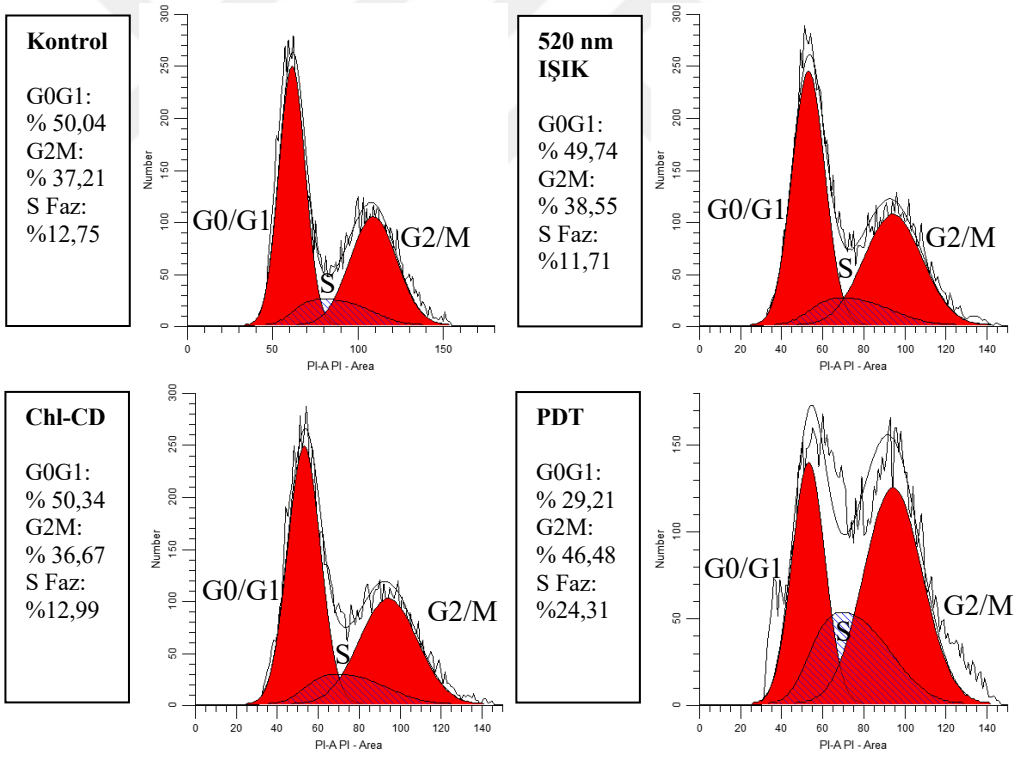
Hücre döngü fazları, hücresel DNA miktarı Akış Sitometri analizi ile değerlendirilmiştir. Şekil 3.16.'da kontrol grupları ile PDT grubu arasındaki hücresel döngü farklılıkları görülmektedir. Yapılan analize göre; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CD + 520 nm ışık uygulaması yapılan gruplarda G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinde düşüş görülmektedir. Bununla birlikte, S ve G2/M fazlarında dikkat çekici bir tutulma dikkat çekmektedir.




**Şekil 3.14**. PDT sonrası hücrelerde apoptoz oluşumu: A549 ve U87 hücre hatları 50 µg/ml Chl-CD inkübasyonundan sonra 1 saat ışık ile irradiye edilmiştir. Apoptotik hücreler, Anneksin boyamasını takiben Akış Sitometrisi' nde analiz edilmiştir. A. A549 B. U87 hücre hattı.




**Şekil 3.15.** PDT sonrası ROS oluşumu: U87 hücreleri 50 µg/ml Chl-CD inkübasyonundan sonra 1 saat ışık ile irradiye edilmiştir. ROS boyaması, FITC filtreli floresan mikroskobunda değerlendirilmiştir. A. Sadece Chl-CD uygulanan grup B. Chl-CD uygulaması sonrası ışık ile irradiye edilen grup (Ölçek çizgisi=200 µm).

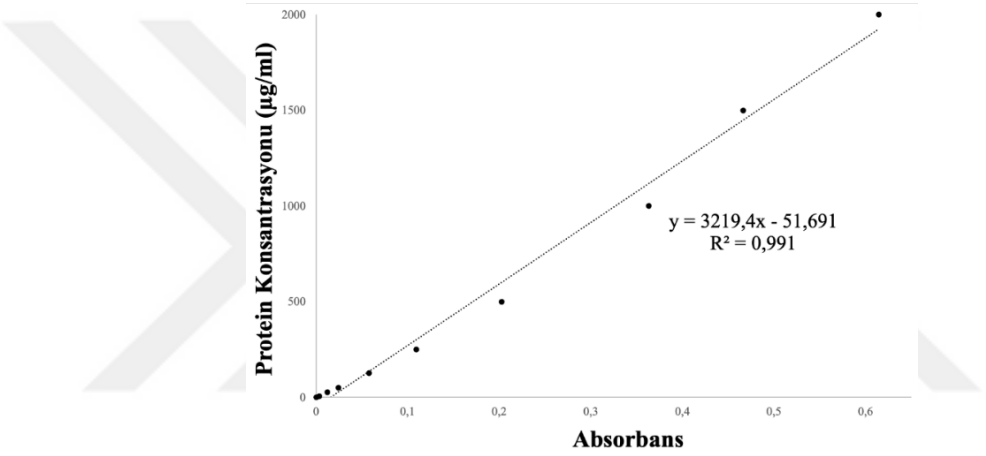



**Şekil 3.16.** PDT uygulamasının hücre döngüsüne etkisi: U87 hücreleri 50 µg/ml CD inkübasyonundan sonra 1 saat ışık ile irradiye edilmiştir. PI boyamasını takiben hücre döngüsündeki tutulmalar Akış Sitometrisi'nde değerlendirilmiştir.

## 3.4. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

### 3.4.1. BCA Analizi

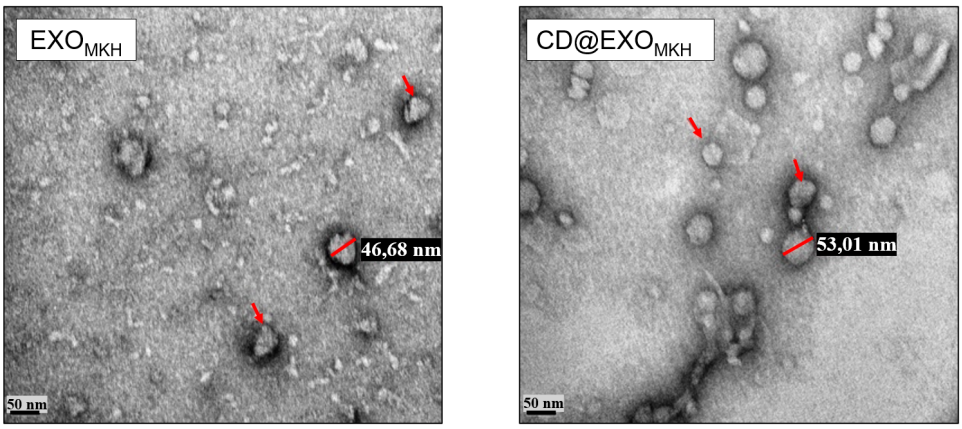
Kit protokolünü takip ederek elde edilen BSA standard kalibrasyon eğrisi kullanılarak toplam eksozom protein miktarları hesaplanmıştır (Şekil 3.17.). Kontrol ve Chl-CD uygulama gruplarında 25 ml süpernatantlardan yaklaşık olarak sırasıyla; 295.05 µg/ml ve 290.98 µg/ml eksozom izole edilmiştir. İzole edilen eksozomlar, soğuk PBS içinde süspanse edilip -80’ de muhafaza edilmiştir.




**Şekil 3.17.** Total eksozom protein miktarının hesaplanması: Eksozom izolasyonundan sonra protein miktarı BCA ile ölçülmüştür. Absorbans ölçümleri spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir.

### 3.4.2. TEM, STEM-EDX ve HR-TEM

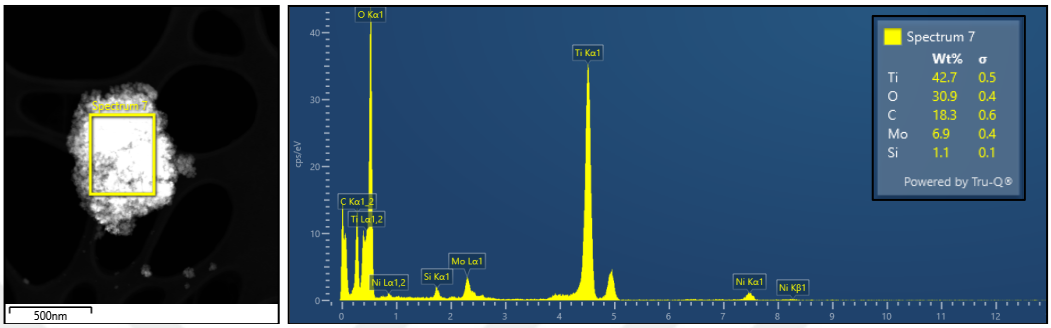
Eksozom morfolojilerini incelemek için TEM görüntülemesi yapılmıştır. Her iki grupta da küresel morfolojiye sahip eksozomlar görülmektedir (Şekil 3.18.). Rastgele yapılan ölçümlerde eksozom çapları sırasıyla; kontrol grubu için 40.68 nm ve Chl-CD taşıyan eksozom grubunda ise 53.01 nm olarak ölçülmüştür. Morfolojik olarak eksozom gruplarında anlamlı bir fark kaydedilmemiştir. Standart TEM görüntülemeleri eksozomlardaki Chl-CD varlığını tespit etmekte yetersiz kalmıştır. Çünkü; Chl-CD' lar kontrast sağlayacak yeterli metal içeriğe sahip değildir ve ayrıca eksozom boyamasında kullanılan UA, alanda kirlilik yaratmaktadır.



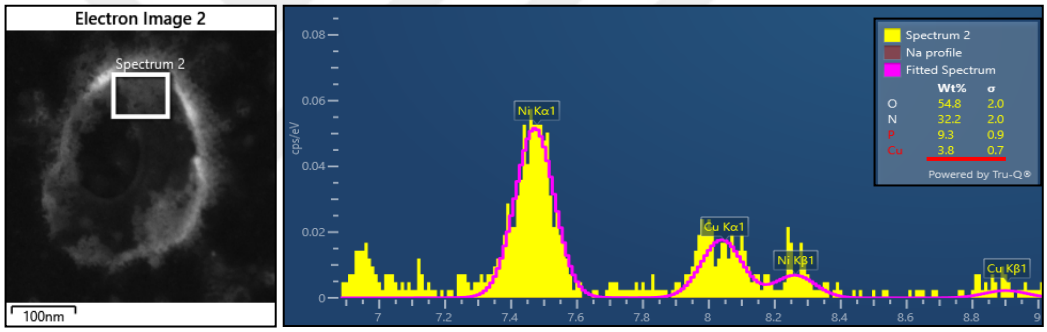

**Şekil 3.18**. Eksozomların morfolojisi: İzole edilen eksozomlar nikel ızgaralara yüklendikten sonra uranil asetat kontrast ajanı ile boyanmıştır. Morfolojik değerlendirmeler TEM' de gerçekleştirilmiştir.

Eksozom içinde ya da yüzeyindeki Chl-CD' ların varlığını tayin etmek için EDX elemental analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.19.A.' da ve Şekil 3.19.B.' de sırası ile kontrol gruplarında Bakır sinyali kaydedilemezken, CD@$EXO_{MKH}$' lerde belirgin şekilde bakır sinyali kaydedilmiştir.

**A.**

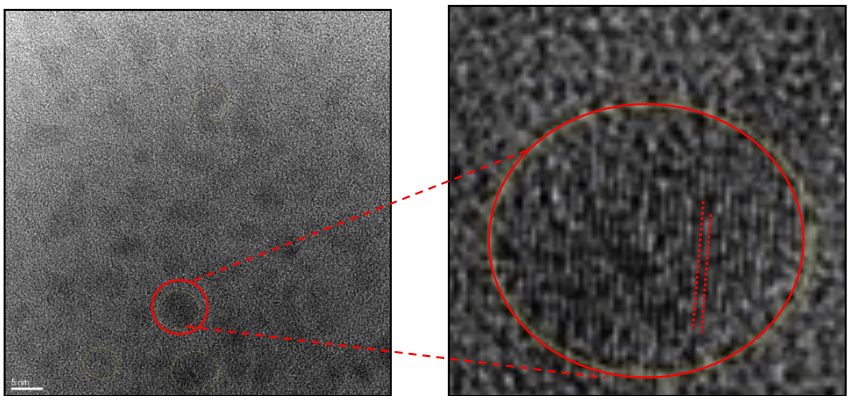



**B.**




**Şekil 3.19.** Eksozom elemental analizi: Eksozomlar, nikel ızgaralara yüklendikten sonra, Chl-CD varlığının tespiti için Bakır sinyal analizi STEM-EDX ile yapılmıştır A. $EXO_{MKH}$, B. CD@$EXO_{MKH}$ .

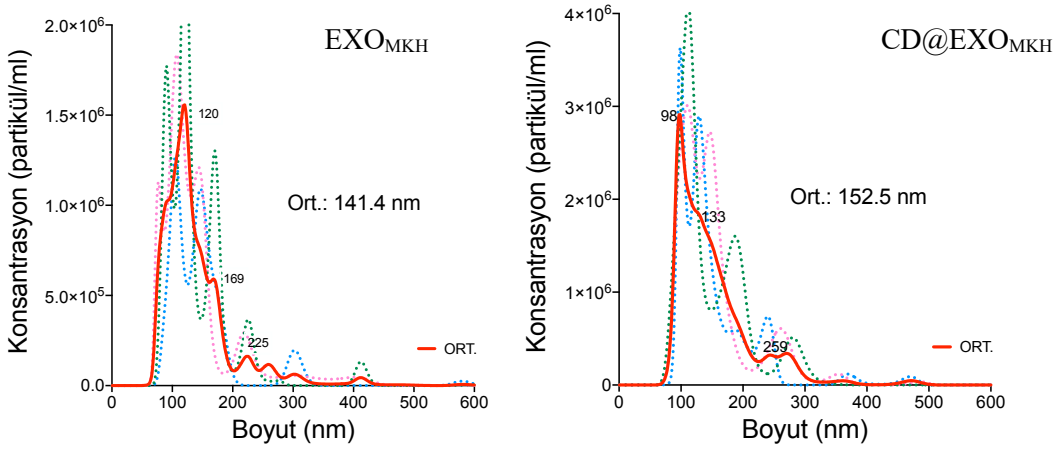
Karbon Dot' lar metalik nanomalzemeler olmadığı için standard TEM görüntülemelerinde eksozom içinde Chl-CD' ların tespiti oldukça zordur. Bu sebeple Chl-CD varlığının tespiti için STEM-EDX analizi ve HR-TEM görüntülemelerinden faydalanılmıştır. Her iki teknikte de sinyal kontaminasyonunu engellemek için herhangi bir kontrast boyama ya da fiksatif kullanılmamıştır. Eksozomlar su içinde kurutuldukları için, özellikle HR-TEM' de, morfolojilerini koruyabilmeleri oldukça zordur. Şekil 3.20.' de CD@$EXO_{MKH}$ gruplarının HR-TEM görüntüleri yer almaktadır. Eksozom morfolojileri korunamadığı için HR-TEM sonuçları Chl-CD' ların lokalizasyonları hakkında bilgi vermemektir. Ancak, CD@$EXO_{MKH}$ örneklerinde Chl-CD varlığını teyit etmektedir.



**Şekil 3.20.** Eksozomlardaki Chl-CD' ların kristal yapısı: Chl-CD yüklü eksozomlar (CD@EXO$_{MKH}$), ızgaralara yüklendikten sonra, Chl-CD kristal yapısındaki kafes boşlukları HR-TEM' de görüntülenmiştir.

### 3.4.3. NTA

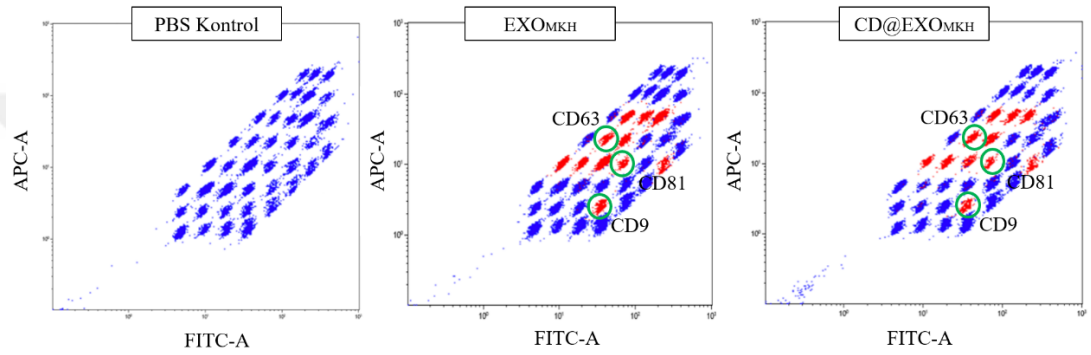
Eksozom boyutları ve partikül konsantrasyonunu ölçmek için NTA analizi gerçekleştirilmiştir. EXO$_{MKH}$ ve CD@EXO$_{MKH}$ grupları karşılaştırıldığın eksozom boyutları arasında anlamlı bir boyut farklı kaydedilmemiştir (Şekil 3.21.). Kontrol grupları ve Chl-CD uygulanan gruplar arasında eksozom boyut ortalamaları sırasıyla; 141,4 $\pm$ 2.8 nm ve 152.5 $\pm$ 1.1 nm olarak ölçülmüştür. Partikül konsantrasyonları ise EXO$_{MKH}$ ve CD@EXO$_{MKH}$ grupları için sırasıyla; 1.18e+08 +/- 1.20e+07 partikül/ml 2.16e+08 +/- 1.96e+07 partikül/ml olarak raporlanmıştır.




**Şekil 3.21.** Eksozom boyut dağılımı: Eksozomların boyut analizleri NTA ile yapılmıştır.

### 3.4.4. Akış Sitometrisi

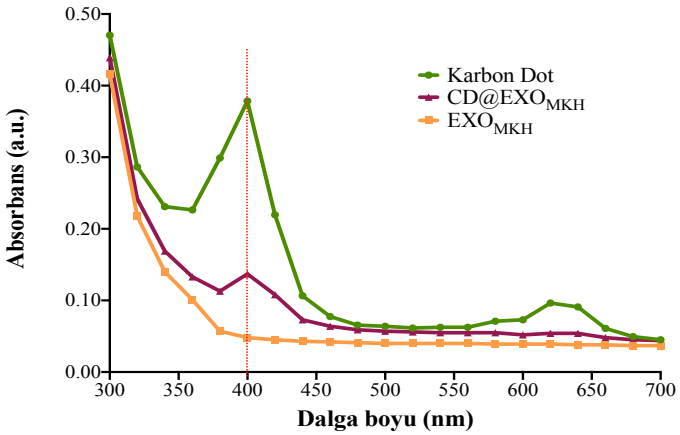
Eksozomların yüzey belirteçleri MACsPLEX Akış Sitometri kiti ile analiz edilmiştir. Spesifik olmayan floresan ışımalar, eksozom içermeyen, sadece boncuk ve floresanlı ikincil antikorları içeren PBS grubunda test edilmiştir. Şekil 3.22.' de; PBS grubunda herhangi bir floresan kaydedilmezken, her iki eksozom grubunda CD63, CD81 ve CD9 ifadelerinin pozitif olduğu görülmektedir. hpMKH' lerin Chl-CD ile inkübasyonunun, eksozom spesifik belirteçlerin ifadesini etkilemediği gözlenmiştir.




**Şekil 3.22.** Eksozom belirteçlerinin ifadesi: Eksozomlar floresan konjugeli CD63, CD81 ve CD9 antikorları ile boyandıktan sonra ifadeleri Akış Sitometrisi' nde değerlendirilmiştir. PBS kontrol grubu sadece lateks boncuk ve antikorlardan oluşup, eksozom içermemektedir. Yeşil halkalarla belirtilen kırmızı noktalar, pozitifliği göstermektedir.

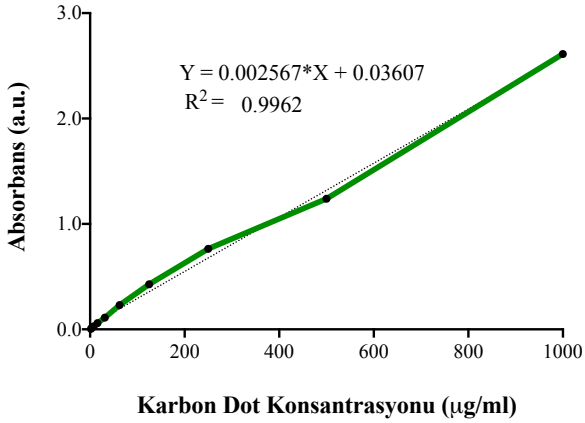
### 3.4.5. Absorbans Spektroskopisi

Serbest Chl-CD, $EXO_{MKH}$ ve $CD@EXO_{MKH}$ örneklerinin absorbansları spektral olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu eksozomlarda ($EXO_{MKH}$) 400 nm' deki karakteristik Chl-CD absorbans piki yer almazken, $CD@EXO_{MKH}$ örneklerinde gözlenen pik Chl-CD varlığına atfedilmektedir (Şekil 3.23.).




**Şekil 3.23.** Eksozomlarda Chl-CD varlığının tespiti: Fenol Kırmızısı içermeyen besiyerinde hazırlanan serbest Chl-CD, boş eksozom ve Chl-CD içeren eksozomlar, 96 kuyulu kültür kaplarına dağıtılıp, spektrofotometrede absorbans okuması alınmıştır. Chl-CD içeren kuyulardan 400 nm' deki karakteristik pik kaydedilmiştir.

Eksozomlu örneklerin içindeki Chl-CD miktarını hesaplayabilmek için, Chl-CD seri dilüsyonları ile oluşturulan 400 nm' deki absorbans kalibrasyon eğrisinden faydalanılmıştır (Şekil 3.24.). Eğri formülüne göre; CD@EXO$_{MKH}$ örneklerinden alınan absorbans değerine karşılık gelen Chl-CD miktarı yaklaşık olarak; 0.262 $\pm$ 0.28 µg Chl-CD / 1 µg eksozom olarak hesaplanmıştır.




**Şekil 3.24.** Chl-CD absorbans kalibrasyon eğrisi: Chl-CD' ların Fenol Kırmızı içermeyen seri dilüsyonları hazırlanmıştır. 96 kuyulu kültür kaplarına 100' er µl dağıtıldıktan sonra, spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı 400 nm absorbans eğrisi oluşturulmuştur.

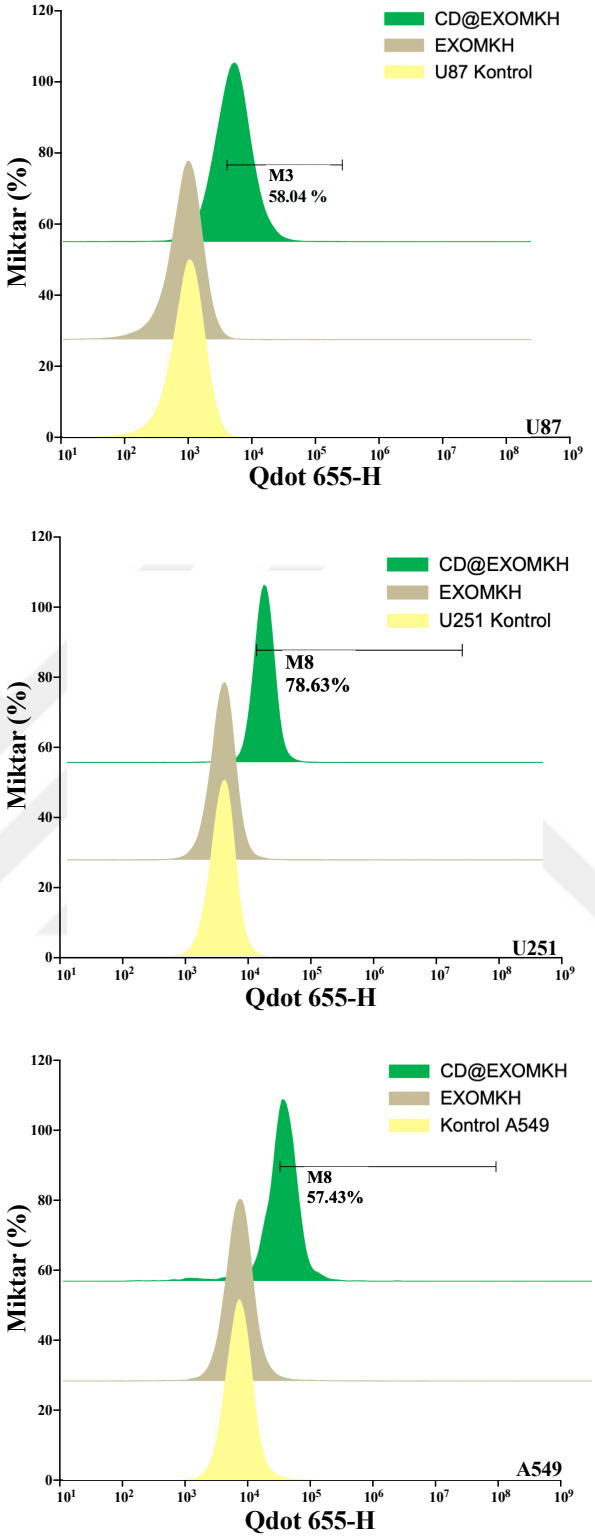
## 3.5. Eksozom Aracılı Fotodinamik Terapi Yanıtının Değerlendirilmesi

### 3.5.1. Eksozomların Kanser Hücre İnternalizasyonu

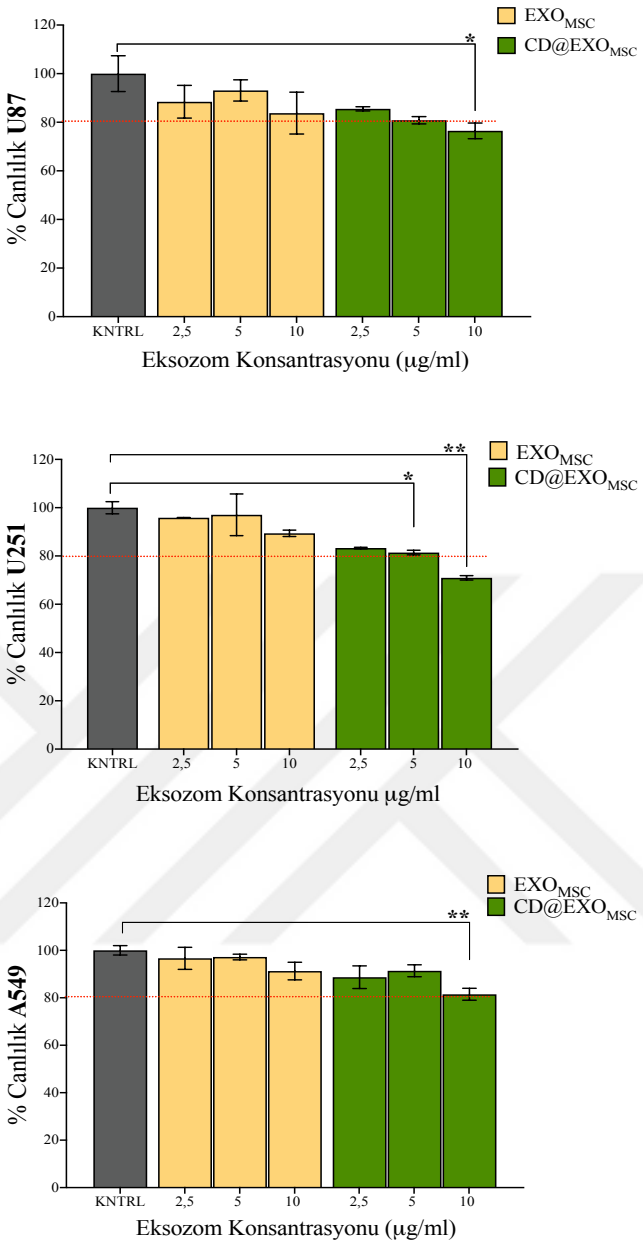
Eksozomların kanser hücrelerine internalizasyonunu değerlendirmek için Akış Sitometrisi kullanılmıştır. Hücreler, eksozomlarla 4 saat inkübe edildikten sonra 400 nm eksitasyon altında Qdot 655 kırmızı filtrede floresan ölçümleri yapılmıştır. Şekil 3.25.' de; eksozom uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerine göre, $EXO_{MKH}$ ve $CD@EXO_{MKH}$ 'larla muamele edilen grupların floresan ölçümleri yer almaktadır. Akış Sitometri analizlerine göre, kanser hücresinin türüne göre internalizasyon miktarı % 50-80 arasında değişkenlik göstermektedir. Eksozom yükleme sürecinde, hpMKH' lere internalizasyonu ve ardından endozomal yolak yolculuğu yapan Chl-CD' ların, kırmızı floresan yeteneğini koruduğu görülmektedir.

### 3.5.2. Eksozomların Hücre Canlılığına Etkisi

Şekil 3.26.' da farklı eksozom konsantrasyonlarının, kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisi görülmektedir. $EXO_{MKH}$ ve $CD@EXO_{MKH}$ örneklerinden 2.5, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda eksozom ile 4 saat inkübe edilen kanser hücrelerinin canlılığı LDH analizi ile değerlendirilmiştir. $CD@EXO_{MKH}$ grupları için; yüksek konsantrasyonda (10 µg/ml ) canlılığın % 80'lerin altına düştüğü gözlenmektedir.




**Şekil 3.25.** Eksozom internalizasyonu: Kanser hücreleri 12 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, eksozomlarla 4 saat inkübe edilmiştir. PBS yıkaması ile internalize olmayan eksozomlar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler toplanıp mavi lazer uyarımında kırmızı floresan kaymaları Akış Sitometrisi' nde analiz edilmiştir.




**Şekil 3.26.** Eksozom sitotoksisitesi: Kanser hücre hatları 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra, farklı konsantrasyonlardaki eksozomlar ile 4 saat inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı LDH ile değerlendirilmiştir. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. *, p< 0.0332; **, p< 0.002)

### 3.5.3. Eksozom Aracılı Fotodinamik Terapi

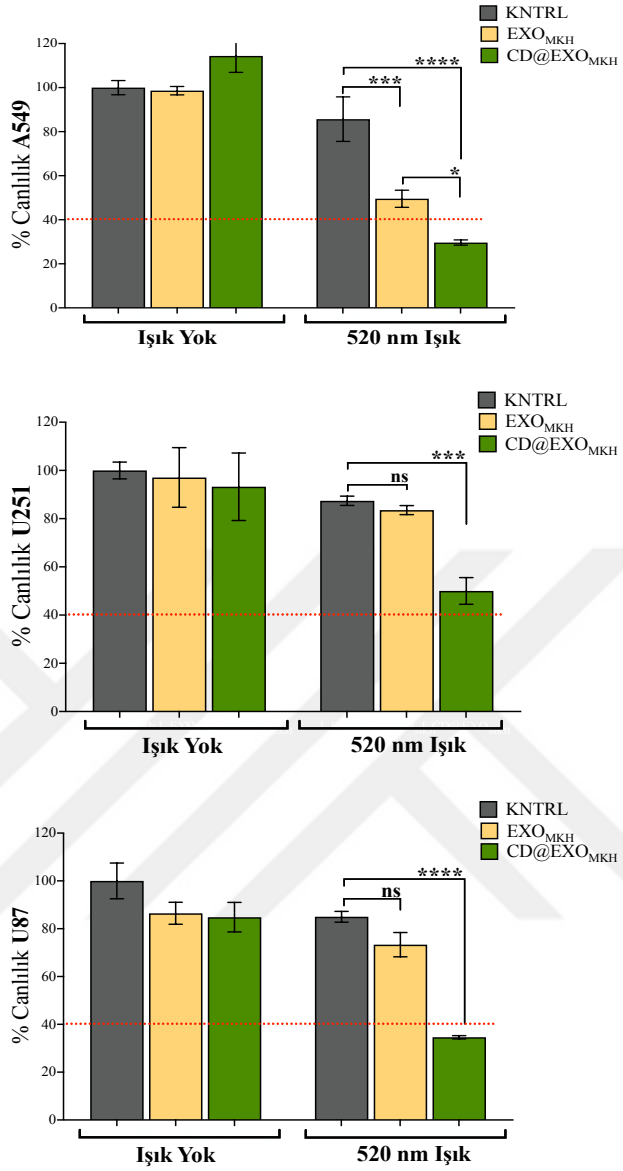
Sitotoksisite sonuçlarına dayanarak, PDT için 5 µg eksozom/ml uygulama yapılmasına karar verilmiştir. Kanser hücreleri 4 saat eksozomlar ile inkübe edildikten sonra, taze besiyerinde 1 saat 520 nm ışık ile uyarılmıştır. Malzeme ve ışık uygulamasını takip eden 12 nci saatte hücre canlılıkları LDH ile değerlendirilmiştir. Şekil 3.27'de, kanser hücre canlılıklarının, ışıksız kontrol grubu hücrelerine göre normalize edilerek yapılan değerlendirmeleri sunulmuştur.

A549 hücre hattında; CD@$EXO_{MKH}$ inkübasyonu ve onu takip eden ışık uygulamasında, hücre canlılığının % 30' lara kadar gerilediği görülmektedir. Ancak Chl-CD içermeyen $EXO_{MKH}$ gruplarında da ışık uyarımı sonrası % 45' e kadar düşen bir hücre canlılığı dikkat çekmektedir (Şekil 3.27.A.).

Şekil 3.27.B.'de ışık uygulanmayan eksozomlu gruplarda, hiçbir uygulama yapılmayan kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir toksisite gözlenmemiştir. CD@$EXO_{MKH}$ ve ışık uygulaması birlikte yapılan gruplarda hücre canlılığının % 40' lara düştüğü gözlenmektedir. A549 hücrelerinden farklı olarak U251 glioblastoma hücre hattında Chl-CD içermeyen $EXO_{MKH}$ ' lu ışık gruplarında anlamlı bir hücre ölümü kaydedilmemiştir.

U87 glioblastoma hücre hattında ise; CD@$EXO_{MKH}$ 'lu ışık gruplarında hücre canlılığının % 40' ların altına düştüğü görülmektedir. Işık uygulaması yapılmayan gruplarda, anlamlı bir hücresel ölüm kaydedilmemiştir (Şekil 3.27.C.).

Eksozom aracılı PDT uygulamasında, CD@$EXO_{MKH}$ ile taşınan Chl-CD miktarı 1,31 µg Chl-CD /ml (5 eksozom µg /ml de) dir. Serbest Chl-CD aracılı PDT uygulaması ile karşılaştırıldığında (50 µg CD /ml) % 40' lara kadar düşen hücre canlılığına, yaklaşık 40 kat daha az Chl-CD kullanılarak ulaşılabildiği görülmektedir.

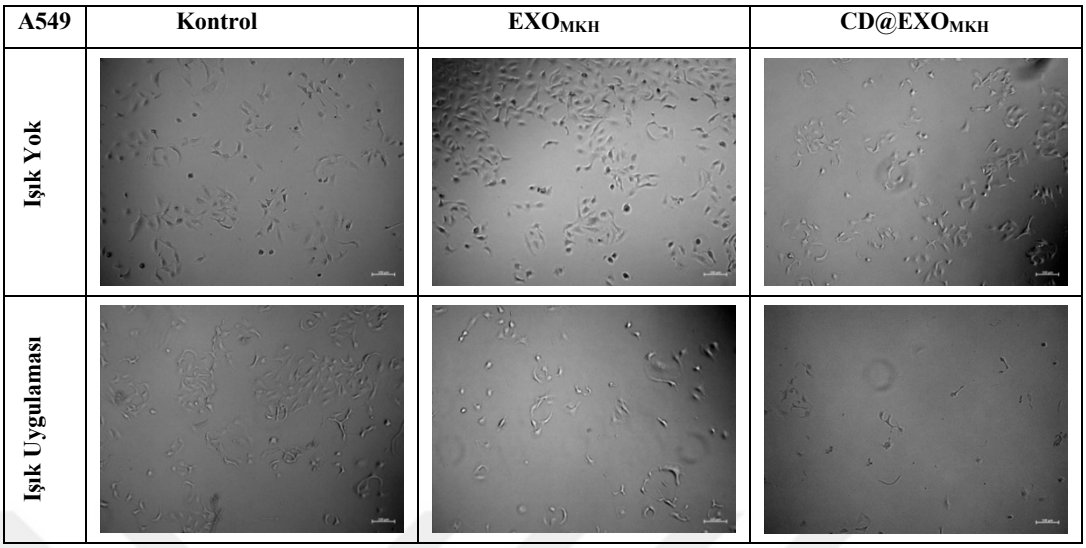



**Şekil 3.27.** *İn vitro* eksozom aracılı PDT: Kanser hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra 5 µg /ml eksozom ile 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler, 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. Hücre canlılığı LDH ile değerlendirilmiştir. A. A549, B. U251, C. U87. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yol ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. (ns), 0.1234; *, p< 0.0332; ***, p< 0.0002; ****, p< 0.0001 ).

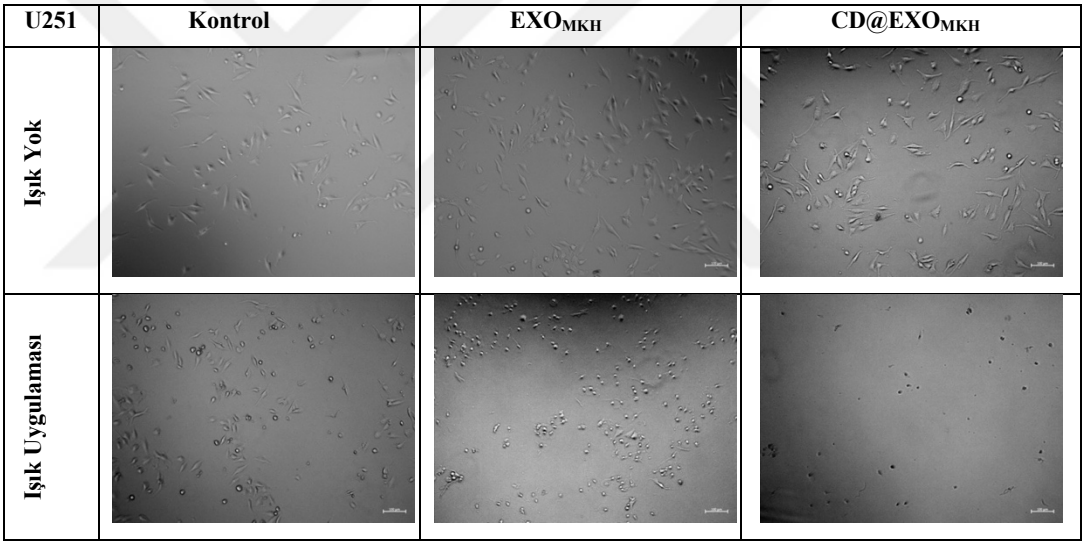
Kanser hücrelerine eksozom aracılı PDT uygulaması yapıldıktan hemen sonra, hücre morfolojileri ters mikroskop altında incelenmiştir. Şekil 3.28.' de sırasıyla; A549, U251 ve U87 hücre gruplarının mikroskop görüntüleri yer almaktadır. A459 hücre hattında; ışık uygulanan hücrelerde hem $EXO_{MKH}$ hem de $CD@EXO_{MKH}$ 'li gruplarda hücre ölümü görülmektedir (Şekil 3.28.A.).

Şekil 3.28.B. ve Şekil 3.28.C.' de sırasıyla U251 ve U87 hücrelerinin eksozom aracılı PDT uygulaması sonrasındaki morfolojik görüntüleri yer almaktadır. Her iki hücre grubunda da ışık uygulanan kontrol gruplarında ışıktan kaynaklı hücre ölümlerinin olduğu görülmektedir. Ayrıca ışık uygulaması yapılan $EXO_{MKH}$ 'li gruplarda; hücrelerin yüzeyden ayrılmalar ve küresel hücre morfolojilerinin varlığı gözlenmektedir. Her iki hücre hattı için de; ışık uygulanan $CD@EXO_{MKH}$'lu gruplarda, alanda anlamlı derecede hücre ölümü seçilebilmektedir.

**A.**

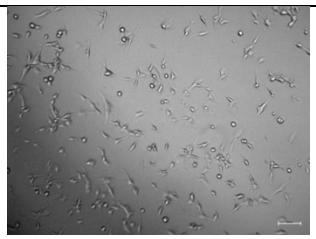
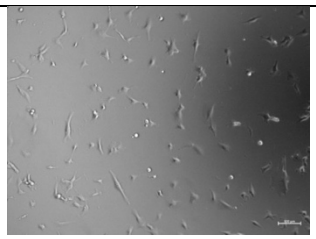
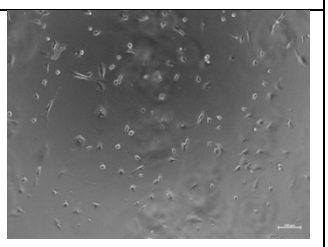
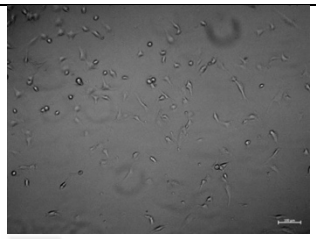
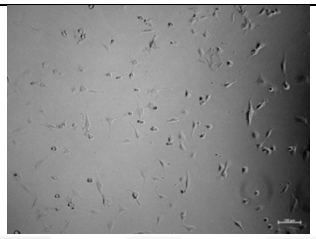
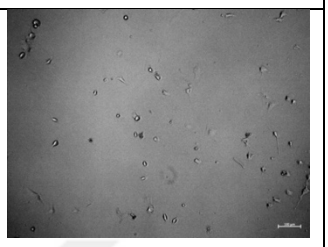



**B.**




**Şekil 3.28.** Eksozom aracılı PDT sonrası hücre morfolojileri: 5 µg/ml eksozom uygulanan hücreler 4 saatlik inkübasyon sonunda PBS ile yıkanıp, taze besiyerinde 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. PDT uygulamasının hemen ardından hücre görüntüleri ters mikroskopta çekilmiştir. A. A549, B. U251, C. U87 hücre hatları (ölçek çizgisi=200 µm).

**C.**

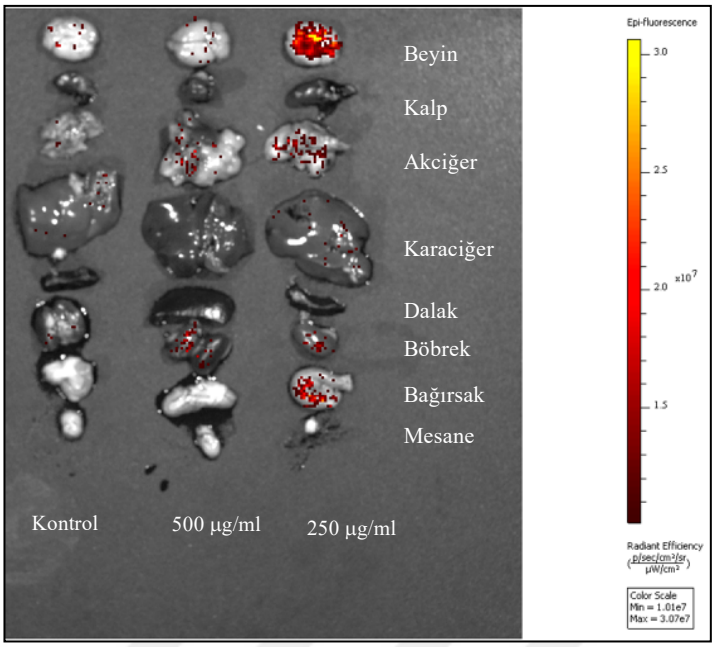
| U87 | Kontrol | $EXO_{MKH}$ | $CD@EXO_{MKH}$ |
|---|---|---|---|
| Işık Yok |  |  |  |
| Işık Uygulaması |  |  |  |

**Şekil 3.28.** ‘ in devamı.

## 3.6. Chl-CD Biyodağılımı, Tümör Boyutları ve Histolojik İncelemeler

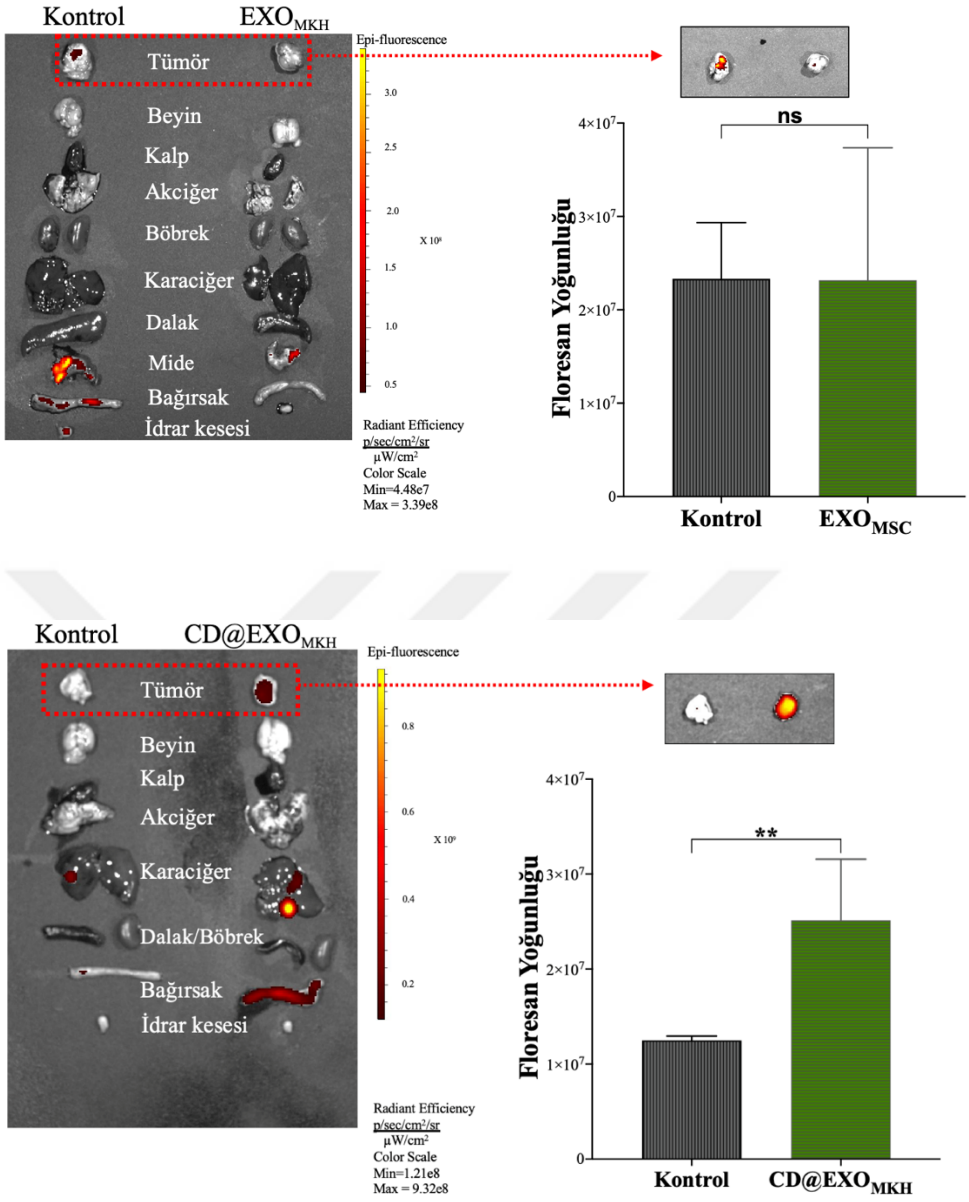
### 3.6.1. Serbest Chl-CD ve Eksozomların Biyodağılımı

Serbest Chl-CD’ların Balb/c farelerdeki biyodağılımını yorumlamak için, iki farklı dozda Chl-CD, kuyruk veninden uygulanmıştır. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra, organlar, IVIS’ de görüntülenmiştir. Şekil 3. 29.’de kontrol grubu ve enjeksiyon yapılan hayvanların organlarından kaydedilen floresan sinyalleri görüntülenmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; düşük konsantrasyondaki (250 µg/ml) Chl-CD enjekte edilen hayvan organlarında, özellikle beyinde, yoğun floresan sinyalleri kaydedilmektedir. Yüksek dozda Chl-CD enjekte edilen grupta (500 µg/ml) ise, kontrol grubuna göre anlamlı bir floresan görülmemektedir.




**Şekil 3.29.** Serbest Chl-CD biyodağılımı: 250 ve 500 µg/ml Chl-CD, Balb/c farelerin kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra Chl-CD' ların intrinsik floresanı IVIS' de görüntülenmiştir.

Kuyruk veninden enjekte edilen eksozomların biyodağılımı, IVIS' de değerlendirilmiştir. Görüntülemeler için ekstra bir boyama yapılmadan, sadece Chl-CD' ların kendi floresan özelliğinden faydalanılmıştır. $EXO_{MKH}$ enjekte edilen hayvanlarda, kontrol grubuna göre anlamlı bir floresan görülmemektedir. Bunun yanı sıra, $CD@EXO_{MKH}$ uygulanan hayvanlarda Chl-CD kaynaklı floresan sinyallerinin, özellikle tümör dokuda yoğunlaşmış olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 3. 30.). Yapılan ROI ölçümlerine göre; kontrol gruplarına kıyasla, $CD@EXO_{MKH}$ uygulanan grup tümörlerinde, floresan yoğunluğunun anlamlı derecede fazla olduğu kaydedilmiştir.

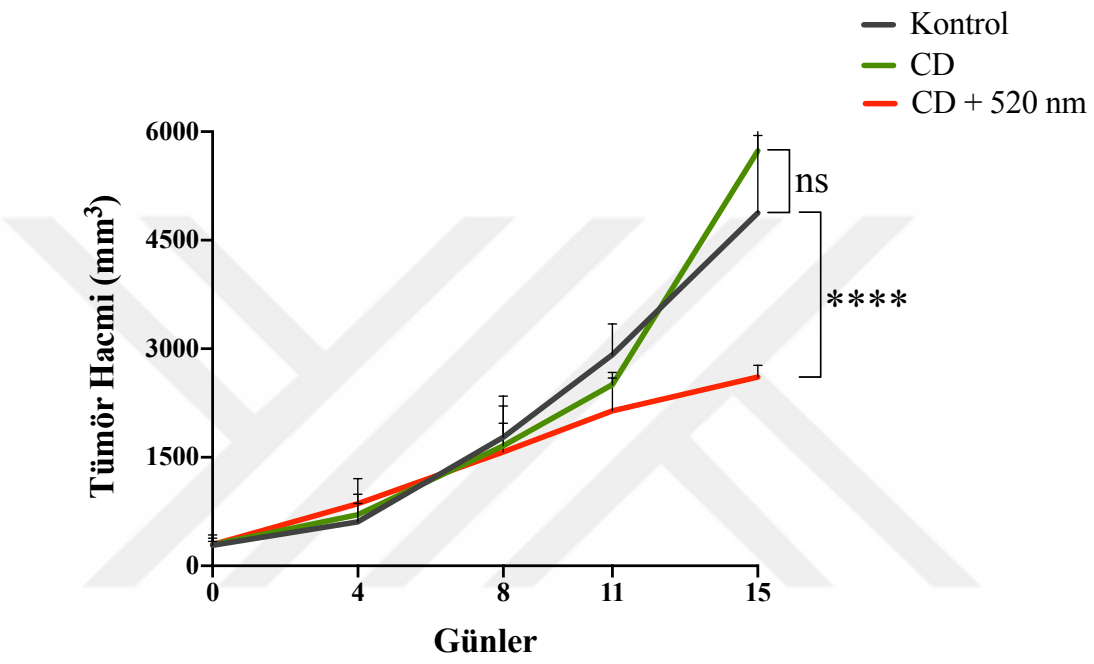



**Şekil 3.30.** Eksozom biyodağılımı: 40 µg/ml $EXO_{MKH}$ ve $CD@EXO_{MKH}$ Balb/c nude farelere kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra, organlarındaki eksozom biyodağılımı IVIS' de değerlendirilmiştir.

### 3.6.2. Tümör Boyutları

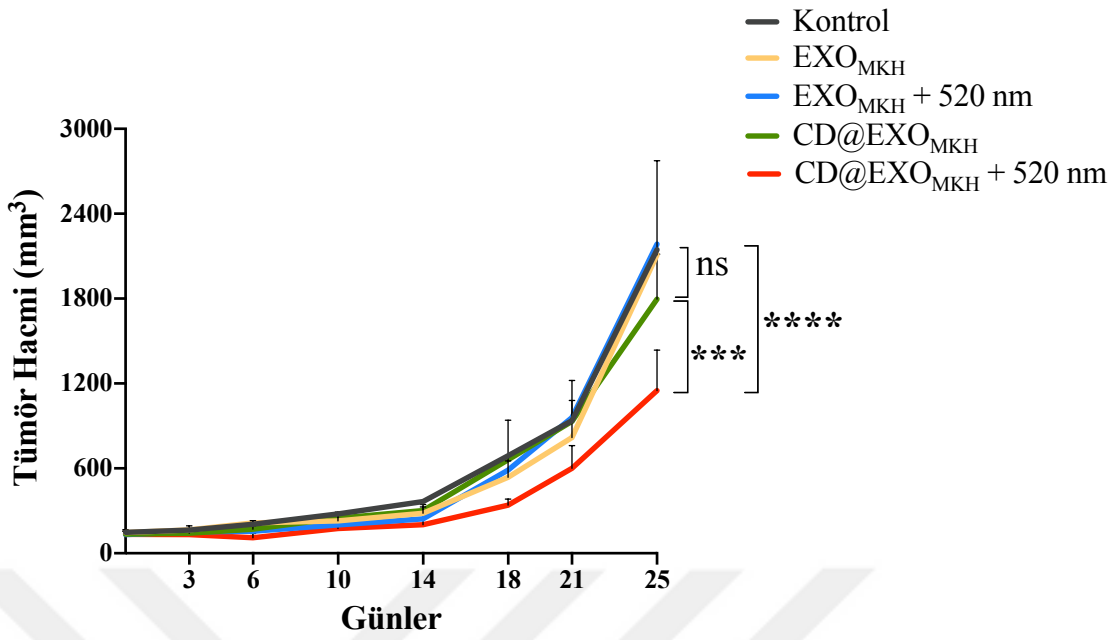
Serbest Chl-CD ile gerçekleştirilen PDT uygulaması için 250 µg/ml Chl-CD, intratümöral olarak uygulanmıştır ve ardından 1 saat ışık ile uyarılmıştır. Uygulama, 3 kez tekrarlamış ve tümör hacimleri ölçülmüştür. Chl-CD + 520 nm ışık uygulanan gruplarındaki

tümör boyutlarının, kontrol ve sadece serbest Chl-CD uygulanan gruplara göre anlamlı derecede küçük olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.31.). Chl-CD ve ışık uygulaması birlikte yapılan gruplarda tümör büyümesi yavaşlarken, sadece serbest Chl-CD uygulanan gruplarda tümör büyümesinin, kontrol grupları ile benzer bir patern gösterdiği görülmektedir. Chl-CD + 520 nm ışık uygulanan grup, kontrol grubuna kıyasla, yaklaşık olarak % 53,50 daha az bir tümör hacmine sahiptir.




**Şekil 3.31.** Serbest Chl-CD aracılı PDT sonrası tümör hacimleri: U87 inokülasyonu ile oluşturulan tümör modelinde 250 µg/ml Chl-CD intratümöral olarak enjekte edilip, ardından tümör bölgesi 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. İşlem 3' er gün arayla tekrarlanmıştır. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. (ns), 0.1234; ****, p< 0.0001 ).

Eksozom aracılı PDT uygulamasında; tek doz 40 µg/ml CD@$EXO_{MKH}$ intravenöz olarak uygulanmıştır ve 24 saat sonra 1 saat ışık ile uyarılmıştır. Şekil 3.32.'de kontrol grubuna kıyasla CD@$EXO_{MKH}$ + 520 nm ışık gruplarındaki tümör büyümesinin anlamlı derecede yavaşladığı görülmektedir. CD@$EXO_{MKH}$ + 520 nm ışık uygulanan gruptaki tümör hacmi, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık % 53,61 daha azdır.

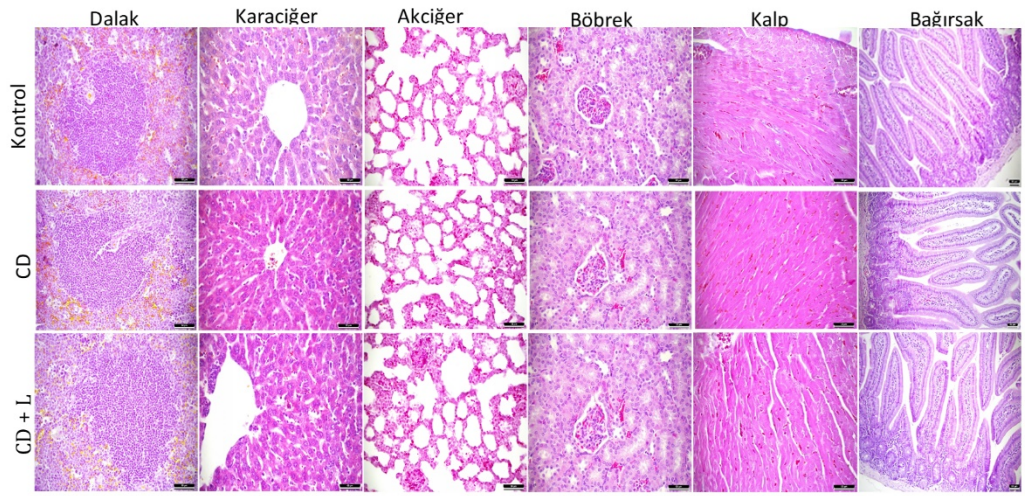



**Şekil 3.32.** Eksozom aracılı PDT sonrası tümör hacimleri: U87 inokülasyonu ile oluşturulan tümör modelinde 40 µg/ml eksozom intravenöz olarak enjekte edilip 24 saat sonra, tümör bölgesi 1 saat 520 nm ışık ile irradiye edilmiştir. (Gruplar, kontrol grubuna göre; 2-Yönlü ANOVA Tukey çoklu karşılaştırma istatistiksel analizi ile değerlendirilmiştir. (ns), 0.1234; ***, p< 0.0002; ****, p< 0.0001).

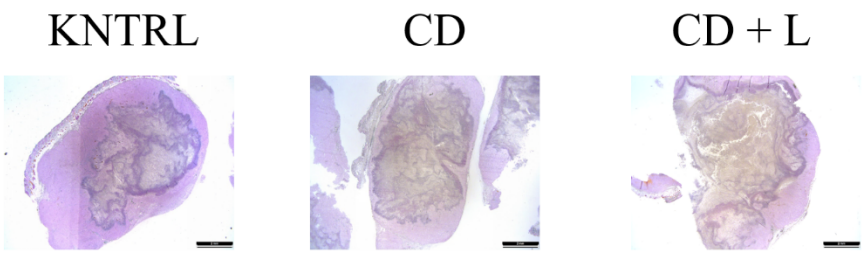
### 3.6.3. Histolojik İncelemeler

Serbest Chl-CD aracılı PDT sonrası toplanan organ kesitleri ışık mikroskobunda incelenmiştir. Distal organ histolojilerinde, herhangi bir malzeme birikimi ya da doku deformasyonu dikkat çekmemektedir (Şekil 3.33.).

Kontrol grubu ve sadece Chl-CD enjekte edilen gruplarda, tümör doku kesitlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak Chl-CD ve ışık uygulamasının yapıldığı PDT' li grup tümörlerinde, doku içi yarılmalar dikkat çekmektedir (Şekil 3.34.).



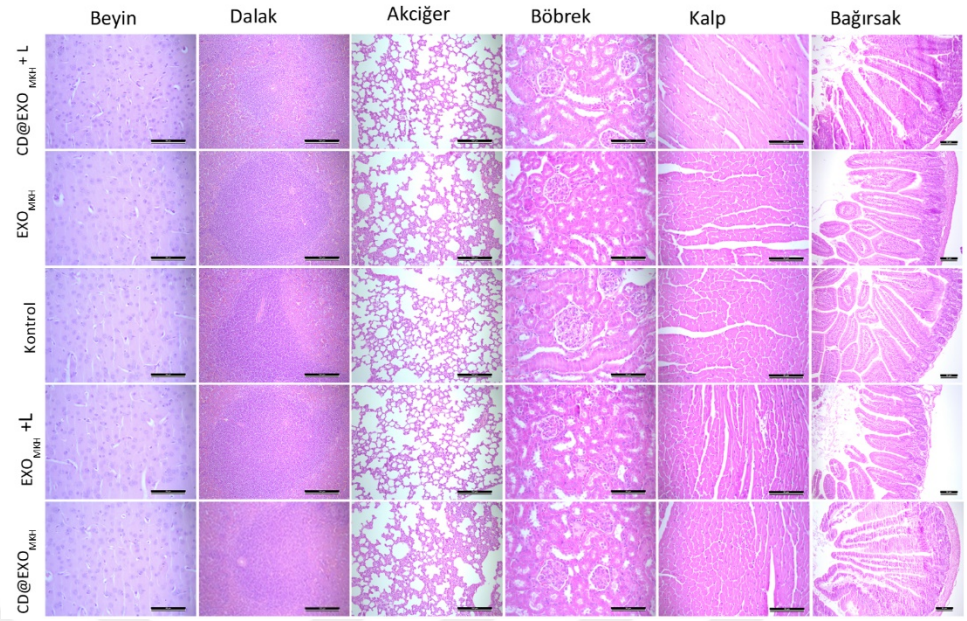

**Şekil 3.33.** Serbest Chl-CD aracılı PDT sonrası organ histolojileri (ölçek çizgisi = 50µm).



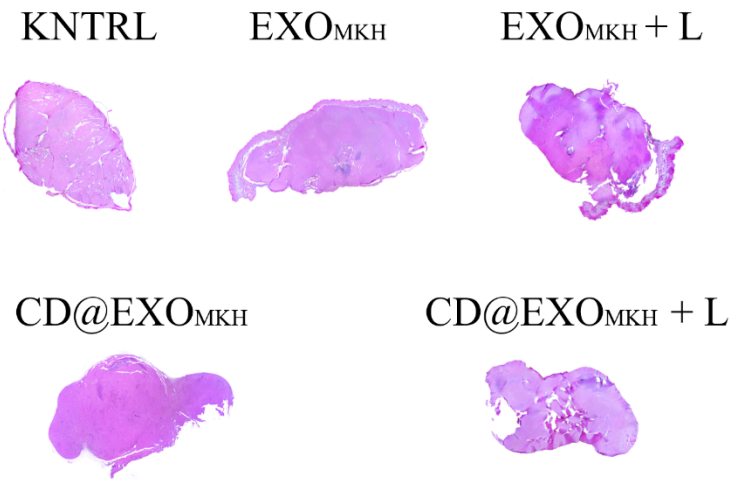

**Şekil 3.34**. Chl-CD aracılı PDT sonrası tümör doku histolojileri (ölçek çizgisi=2 mm).
KNTRL: Kontrol, CD: Karbon Dot, CD+L: Karbon Dot + Işık uygulaması.

Şekil 3.35' de eksozom aracılı PDT uygulamasının ardından, distal organlardaki histolojik incelemeler yer almaktadır. Organlarda herhangi bir doku kaybı, lezyon oluşumu ya da malzeme birikimi görülmemektedir.

Eksozom aracılı PDT' te CD@$EXO_{MKH}$ + Işık uygulanan gruplarda tümör dokuda yarılmalar ve lifli görünümde artma gözlenmiştir. Dokularda apoptotik/nekrotik hücrelerin sayısında artış dikkat çekmektedir. Kontrol grubu tümör kesitlerinde doku bütünlüğünde bozulmalar gözlenmiştir. Kontrol grubu tümörlerindeki aşırı büyüme, dokularda ciddi derecede nekroz oluşumuna sebebiyet vermiştir. Histolojik kesitlerde, kontrol grubundaki doku yarılmalarının bu sebeple gerçekleştiği düşünülmektedir (Şekil 3.36.).




**Şekil 3.35.** Eksozom aracılı PDT sonrası organ histolojileri (ölçek çizgisi= 50 µm).




**Şekil 3.36**. Eksozom aracılı PDT sonrası tümör doku histolojileri.
KNTRL: Kontrol, $EXO_{MKH}$: MKH eksozomları, $EXO_{MKH}$+L: MKH eksozomları + Işık, $CD@EXO_{MKH}$: Karbon Dot içeren eksozomlar + Işık uygulaması.

# 4. TARTIŞMA

Boyutları, yüzey özellikleri, iletkenlikleri, suda yüksek çözünürlükleri, ilaç konjugasyonuna elverişlilikleri ve fizikokimyasal özellikleri sebebiyle nanomalzemelerin biyomedikal alandaki kullanımı hızla artmaktadır (Chatterjee & Dhibar, 2023). Karbon Dot' lar; yüksek biyouyumluluk, fotostabilite ve fotokatalitik özellikleri sayesinde son yıllarda hem görüntüleme hem de tedavi ajanı olarak, teranostik teknolojilerde öne çıkan karbon temelli nanomalzemelerdir (Mandal vd., 2023).

Biyogörüntüleme sistemlerinde; derin doku penetrasyonu sağlayan, doku zararını minimalize eden ve doku temelli, çoğunluğu mavi alanda bulunan, otofloresanı elimine edebilen kırmızı emisyona sahip malzemeler tercih edilmektedir (Mohsin vd., 2022). Araştırmalar çoğunlukla nanomalzemelerin boyut kontrolü, yüzey kusurları, sentez koşulları ve kaynak malzemesine yoğunlaşarak kırmızı emisyon özelliğini arttırmaya yönelmektedir. Ancak, kırmızı emisyonlu nanomalzeme sentezi oldukça zordur (Etefa vd., 2024). Porfirin gibi aromatik halkaların veya metal iyonlarının nanomalzeme bünyesine dahil edilmesi; kırmızı emisyon kaymasını, fotostabiliteyi ve floresans yoğunluğunu arttırabilmektedir (Reagen vd., 2022), (Yue vd., 2022). Tez çalışmasında kullanılan Chl-CD'lerin, klorofil kaynaklı porfirin halkasını ve bakır elementini ekstra bir müdahale gerektirmeksizin bünyelerinde hâlihazırda taşıdıkları gözlenmiştir. Optik özellikleri analiz edildiğinde, yeşil ışık uyarımında kırmızı bir emisyona sahip olduğu kaydedilmiştir (Şekil 3.1.). Biyouyumluluğu, kolay uygulanabilirliği ve kırmızı floresan özelliği ile biyogörüntüleme sistemleri için elverişli bir aday olduğu düşünülmektedir.

Yapılan elemental analizde Chl-CD' ların içeriğinde Bakır elementinin varlığı dikkat çekmektedir (Şekil 3.2.). Bakır; geniş pH aralığında reaksiyon yanıtı verebilen, Fenton-benzeri reaksiyonları katalizleyerek ferroptozis, apoptozis, kuproptozis gibi programlı hücre ölümlerini indüklediği bilinen metal bir elementtir (Y. Li vd., 2023). Aynı zamanda Bakır' ın tümör dokuda ROS' ların ortamdan temizlenmesinde görev alan Glutatyon' u (GSH) tükettiği bilinmektedir (Xiong vd., 2021). Bu sebeple tümör mikroçevresindeki Bakır miktarındaki artış, PDT gibi ROS temelli tedavi yaklaşımlarında yanıtın güçlenmesine katkı sağlayabilir. Buradaki kritik nokta; sistemik toksisiteye neden olabilecek Bakır $^{+2}$ ($Cu^{++}$) 'ın sisteme nasıl güvenli bir şekilde dahil edilebileceğidir (Q. Xia vd., 2022). Karbon Dot içeriğinde yer alan Bakır, öncül malzeme olarak kullanılan klorofilden kaynak almaktadır ve Chl-CD sentezi sırasında korunarak nanomalzemenin yapısına dahil olmuştur. Karbon Dot çekirdeğinde $Cu^{++}$

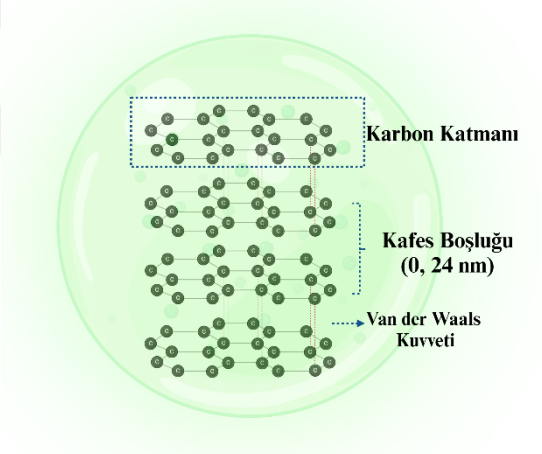
formunda bulunan Bakır, toksisitesi zayıflatılmış şekilde hücrelere taşınmaktadır. $Cu^{++}$ iyonunun, kanser hücrelerinde bulunan $H_2O_2$ ile girdiği Fenton-benzeri reaksiyonu sonucunda $Cu^{+}$ formuna geçerek, açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ($O_2^{-\bullet}$) ile PDT' nin sitotoksik etkisine katkıda bulunabileceği vurgulanmıştır (Kirbas Cilingir vd., 2024). Bakırın Chl-CD' larda bulunan formu ve düşük miktarının, Chl-CD toksisitesi için tehdit oluşturmadığına inanılmaktadır. Bakır varlığının, Chl-CD' un hem optik özelliğini hem de terapötik etkisini destekliyor olabileceği düşünülmektedir.

Nanomalzemelerde boyut, şekil, içerik ve yüzey özelikleri biyolojik yapılarla olan etkileşimini doğrudan etkilemektedir. Boyutları küçüldükçe malzemelerin biyolojik bariyerleri geçişi kolaylaşmaktadır (Y. Liu vd., 2023). Aynı zamanda, artan yüzey alanı/hacim oranı sayesinde yüksek miktarda aktif malzeme konjugasyonuna olanak sağlamaktadır (L.-X. Zhao vd., 2024). Perini ve ark., < 20 nm boyutları sayesinde Grafen Kuantum Dot' ların, KBB' ni rahatlıkla geçebildiklerini göstermiştir (Perini vd., 2020). Boyut özelliklerinin yanı sıra, nanomalzemenin moleküler ağırlığı, yüzey yükü ve fonksiyonel grupları da bariyer geçişini ve hücre internalizasyonunu etkilemektedir. Moleküler ağırlığı 400 Da' nın altındaki moleküllerin KBB' yi geçebileceği bildirilmektedir (Z. Zhao vd., 2015). Bununla birlikte, hafif negatiflik veya nötr yüzey yüküne sahip malzemelerin hücresel etkileşiminin, pozitif yüklü malzemelere kıyasla düşük toksisite, yüksek stabilite ve optimal etkileşim ile sonuçlanacağı belirtilmektedir (Kiio & Park, 2021), (P. Zhang vd., 2022). Yüksek negatif yüke sahip nanomalzemelerde ise, bağışıklığın uyarılması ve elektrostatik iticiliği sebebiyle internalizasyonun azalması söz konusudur (Fan vd., 2023). Çalışmada kullanılan Chl-CD' ların 2-3 nm boyut, 335 Da moleküler ağırlık ve -0,45 mV yüzey yüküyle, teranostik uygulamalarda oldukça elverişli olacakları düşünülmektedir (Kirbas Cilingir vd., 2024).

Metalik nanomalzemelerle (Fe, Au, Ag, TiO2 vb.) kıyaslandığında, karbon bazlı nanomalzemeler düşük kontrasta sahiptir. Bu sebeple, bu tip nanomalzemelerin biyolojik örneklerdeki (doku, hücre vs.) varlığını tespit etmekte TEM gibi görüntüleme teknikleri yetersiz kalabilmektedir (Sousa vd., 2022), (Schrand vd., 2010). Bu noktada nanomalzemenin optik özelliklerinden, elemental analizinden ya da kristal yapılarından faydalanılabilir. EDX elemental analizi, seçilen spektrum alanında bakır varlığına dair nitel ve nicel bilgiler verebilmektedir (Asghar & Asghar, 2020). Ancak, nanomalzemenin alana homojen dağılmama ihtimali, agregasyon eğilimi ve alandaki sinyal kontaminasyonları göz önüne alınmalıdır. EDX, malzemenin yüzey element kompozisyonu hakkında bilgi verirken, kalın yapılarda malzemenin derin bölgelerini etkilemeyecektir. Bu sebeple elementin

nanomalzemedeki kesin miktarı hakkında bilgi edinmek için ICP-MS, MP-AES gibi kantitatif sonuç verebilen tekniklerle valide edilmesi gerekebilir.

Karbon Dot' ların kristal morfolojisinde, düzlemsel olarak yerleşen karbon atom katmanları yer almaktadır. Bu katmanlar birbirleri ile Van der Waals bağlar ile bağlanırlar ve aralarındaki mesafe kafes boşluğu olarak adlandırılır (Şekil 4.1.). Katmanlar arasındaki mesafe ve düzenlilik, nanomalzemenin optik ve elektrostatik karakterini etkiler (Ozyurt vd., 2023). Kafes boşluk mesafeleri, nanomalzemelerin sadece karakterizasyonu için değil, aynı zamanda biyolojik bir örnek içinde nanomalzemenin varlığını tespit etmek için de kullanılabilir. Düzenli karbon katmanları organik bileşiklerde yer almadığından dolayı, nanomalzemeler için ayırt edici bir özelliktir (Slepičková Kasálková vd., 2021). Bu öngörüden yola çıkarak; tez çalışmasında HR-TEM tekniğinin, malzeme tespitinde kullanılabilirliği test edilmiştir ve eksozom bünyesine dahil olan Chl-CD' ların kristal yapısı görüntülenebilmiştir.




**Şekil 4. 1.** Karbon Dot' ların kristalin yapısında yer alan kafes boşlukları.

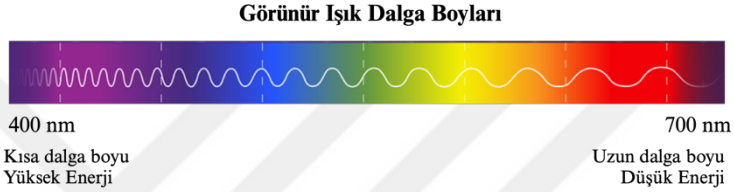
Nanomalzemenin hücre içinde karşılaşabileceği degradasyon, transformasyon ya da eliminasyon süreçleri hakkında ayrıntılı bilgi edinmek ve afinite gösterdiği biyomolekül ya da organelleri belirlemek, hedefli tedavi yaklaşımlarında büyük önem taşımaktadır (Miguel vd., 2021). Bu bağlamda, nanomalzemenin hücre içindeki yolculuğunu takip etmek için optik özelliklerinden faydalanmak oldukça tercih edilen bir yöntemdir. Konfokal mikroskop ile yapılan değerlendirmelerde, Chl-CD'ların yoğun kırmızı floresans özelliğinin hücre görüntülemelerinde kullanılabilir olduğu görülmektedir. Ancak; intraselüler lokalizasyon hakkında kesin bilgi edinebilmek için, Chl-CD'nin daha düşük konsantrasyonlarda ve yüksek çözünürlüklü görüntüleme sistemleri ile değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki Chl-CD' ların agregasyona olan eğilimleri, internalizasyon

yollarını etkiliyor olabilir ve hücre membranında tutulmalara sebep olabilir (W. Wang vd., 2021). Akış sitometri, Chl-CD' ların hücre internalizasyonunu yorumlamak için kullanılmıştır. Hiçbir boyama ya da konjugasyona ihtiyaç duymaksızın, Chl-CD' ların kendi floresan özelliğinden faydalanılarak konfokal ölçümleri doğrulanmıştır. Konfokal Mikroskobu'na kıyasla, düşük konsantrasyonlarda dahi nicel ölçüm yapma imkanı sağlayan Akış Sitometrisi' nin Chl-CD tespiti için daha uygun bir ölçüm aracı olduğu düşünülmektedir. Akış sitometri verilerine göre, hpMKH' lerin kanser hücrelerine göre daha fazla Chl-CD floresana sahip olduğu dikkat çekmektedir. hpMKH' lerin yüzey bileşenleri, yükü, metabolizması, ilaç direnç ve ekzositoz mekanizmaları kanser hücrelerinden farklılık gösterebilir (Ghirardello vd., 2022), (Sun vd., 2023). Dolayısı ile, hpMKH' lerde daha fazla Chl-CD' un hücre içine alındığı ya da alınan malzemenin hücre içinde daha uzun süreyle tutulmuş olabileceği düşünülmektedir.

Optik özelliklerinin yanı sıra, Chl-CD tespitinde içerik bileşenlerinden de faydalanılabilir. Bakır, metalik bir elementtir ve MP-AES, ICP-MS gibi elemental analiz teklikleri ile tespiti yapılabilir (Baranyai vd., 2020). Hücre ya da eksozom gibi biyolojik örneklerde, Chl-CD internalizasyonuna bağlı olarak, Bakır miktarı az olacağı için bu tez çalışmasında tespit kapasitesi daha hassas olan ICP-MS tercih edilmiştir. Chl-CD ile muamele edilen hpMKH' lerden Bakır ölçümü yapılmıştır ve hücrelerdeki Chl-CD varlığı değerlendirilmiştir. Bu ve ark.' nın çalışmasında; CD internalizasyonunun, inkübasyonun beşinci dakikasından itibaren başladığı ve dördüncü saatte maksimum noktaya ulaşarak, plato evresine geçtiği belirtilmektedir (Bu vd., 2020). Tez çalışmasında, internalizasyon analizleri, Chl-CD floresan özelliği ve içerik bileşenlerinden faydalanılarak değerlendirilmiştir. Her iki analiz de literatürü destekler nitelikte sonuçlar vermiştir. Böylelikle, Chl-CD tespiti için Akış Sitometri ve ICP-MS gibi iki farklı tekniğin de uygun olduğu gösterilmiştir.

Absorbans ölçümlerine dayanarak, Chl-CD' ların, 400 nm dalga boyundaki ışığı absorbe ettiği bilinmektedir (Şekil 3.31.). Dolayısı ile, PDT aktivitesini bu absorbans değerine yakın alandaki bir ışıkla uyarıldığında göstermesi beklenir (Düzgüneş vd., 2023). Ancak burada 520 nm uyarımda daha efektif bir PDT yanıtı gözlenmektedir. Tümör mikro çevresindeki hipoksik koşullar, enzimler ve düşük pH, nanomalzemelerin fotokimyasal özelliklerinin değişmesine sebep olabilir (Y. Xia vd., 2022). Ayrıca; Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) olarak bilinen; uyarılmış PS' nin, çevredeki bir moleküle enerjisini aktarması ile farklı bir molekülü aktifleştirmesi gibi bir mekanizmanın da devreye girmiş olabileceği düşülmektedir (J.-J. Cao vd., 2020), (Uprety & Abrahamse, 2022).

Kırmızı dalga boyundan, maviye doğru ilerledikçe dalga boyu kısalırken, enerjisi artar (Şekil 4.2.). Bu sebeple; biyolojik sistemlerde 520 nm yeşil ışık kullanımının, mavi dalga boyundaki ışığa kıyasla daha güvenli ve derin penetrasyonda çalıştığı söylenebilir (J. Wang vd., 2015). Bir saatlik ışık uyarımının, Chl-CD' ları aktifleştirdiği ve anlamlı derecede hücre ölümü gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 3.12. A ve Şekil 3.12. B). Ancak nihai hedefte, klinik uygulamalar için her ne kadar yeşil alan güvenli bölgede sayılsa da bir saatlik uzun uygulama süresi, hasta konforu açısından uygun olmayabilir. Bu sebeple, LED ışık kaynağına kıyasla, yoğunlaştırılmış ışık imkanı sağlayan lazer ışığın kullanılmasının uygulama süresini kısaltarak daha etkili bir tedavi sağlayabileceği düşünülmektedir (J. Wang vd., 2015).




**Şekil 4.2**. Görünür ışık spektrumları.

Kanser tedavilerinde malign hücrelerde nekrotik hücre ölümüne kıyasla, apoptoz gibi programlı hücre ölümleri tercih edilir (Mishra vd., 2024). Çünkü, programlı hücre ölümlerinde, bölgedeki toksik hücre içeriği ve kalıntıları, makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositozla ortamdan uzaklaştırılır. Dolayısı ile nekroz gibi kontrolsüz hücre ölümlerinin sebebiyet verdiği inflamasyon ve çevre doku hasarları minimalize edilmiş olur (Kourtzelis vd., 2020). Karbon Dot aracılı PDT uygulamasında, kanser hücrelerinde apoptozun uyarıldığı görülmüştür (Şekil 3.14.). Ancak farklı hücre tiplerinde PDT yanıtı değişkenlik gösterebilir. Özellikle kanser hücrelerinde; hücre heterojenliği, nanomalzemenin internalizasyon yolağı ve miktarındaki değişkenliği, ilaç direnç mekanizmaları, oksijen miktarı, tümör mikroçevresi, genetik ve epigenetik farklılıklar bu yanıtın değişmesinde rol alabilir (Crucitta vd., 2022), (Casas vd., 2011), (Bustamante & Palavecino, 2023), (F. Wei vd., 2021), (Aebisher vd., 2024), (Aniogo vd., 2021). Apoptozla birlikte farklı hücre ölüm yolaklarının da eş zamanlı olarak aktifleşmesi mümkündür. Tez çalışmasında kullanılan Chl-CD' lar ile gerçekleştirilen önceki çalışmamızda, Ferroptoz ilişkili gen ifadelerine bakılmış, Ferroptotik hücre ölümünün apoptoza eşlik ettiği görülmüştür (Kirbas Cilingir vd., 2024). Foto Dinamik Terapi' nin temel özelliği, hücresel bileşenlerin (DNA, proteinler ve lipidler) oksidatif strese maruz kalması ve buna bağlı olarak, hücre bütünlüğünün hasar görmesidir. Hücrelerdeki oksidatif hasarın birincil hedefi lipidlerdir (Itri vd., 2014). Ferroptotik hücre

ölümünde; artan oksijen radikalleri ve aksayan antioksidan sistemin bir sonucu olarak hücre membranında lipid peroksidasyonu meydana gelir (Chang vd., 2024), (H. Wang vd., 2023). ROS oluşumunun aktif şekilde yayılmasından sorumlu olan lipid peroksidasyon ürünleri hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik sinyal yollarını uyarabilir (Gaschler & Stockwell, 2017). Ferroptozis benzeri programlı hücre ölümlerinden bir diğeri de Kuproptozdur. Kuproptoz; henüz 2022 yılında literatüre kazandırılan, hücre içi bakır homeostazisinin bozulması ile tetiklenen ve mitokondriyal Trikarboksilik Asit (TCA) döngüsü ile ilişkili bir hücre ölüm şeklidir (Tsvetkov vd., 2019), (Z. Wu vd., 2023), (Y. Qi vd., 2023). Tez çalışmasında kullanılan Chl-CD' lar aracılığı ile hücre içine taşınan Bakır elementinin Kuproptoz için potansiyel bir uyarıcı olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, Kuproptoz ile ilişkili gen ifadeleri ve uyarılabilecek olası yolakların analizi için omik yaklaşımlardan faydalanılarak Chl-CD aracılı PDT'nin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması gerektiğine inanılmaktadır.

Kanser terapi stratejilerinde Hücre Döngüsü (HD) basamaklarını hedeflemek, efektif bir hücre ölümü ile sonuçlanabilir (Moloudi vd., 2023). S fazında DNA replikasyonu meydana gelir ve bu aşamada, onarım mekanizmalarında görev alan proteinler oldukça aktiftir. S fazındaki hücrelerin hedeflenmesi, ışık hassas ajanın internalizasyonunda ve ROS üretiminde artışa sebep olabilir (Helleday & Rudd, 2022). Böylelikle, geniş çaplı DNA hasarı ve kontrol noktası hataları nedeniyle, proliferasyonun engellenmesi ile sonuçlanır (Dias vd., 2021), (Sang vd., 2022). Chl-CD aracılı PDT uygulanan kanser hücrelerinde S ve G2 fazlarındaki tutulmalar görülmektedir (Şekil 3.16.). Hücre döngüsü fazlarında S ve G2' de birlikte tutulma olması, kombine bir etkinin olabileceğinin işareti olarak yorumlanmıştır.

Eksozomlar, hücreler tarafından salgılanan veziküllerdir ve kaynak hücresini temsil ederler. Bu sebeple eksozomlar, patolojik durumlarda hastalık belirteci olarak değerlendirilebilmektedir (Marjani vd., 2024). Aynı zamanda kaynak hücre özelliklerine bağlı olarak rejenerasyonu destekleyici ajanlar olarak da kullanımları mümkündür (Roszkowski, 2024). Eksozomların ilgi çekici bir diğer kullanım alanı ise ilaç taşıma sistemleridir (V. Sharma & Mukhopadhyay, 2024).

Bu tez çalışmasında, eksozomların hedef belirleme yeteneklerinden faydalanılarak, kanser hücrelerine terapötik ajan taşıma aracı olarak kullanılması hedeflenmiştir. Bu bağlamda, eksozom kaynağı olarak yüksek kanser hedefleme kapasitesi ve düşük immünojeniteleri sebebi ile hpMKH' ler tercih edilmiştir (Peak vd., 2018). Kök hücre uygulamalarının biyodağılım, farklılaşma, çoğalma, tekrarlayan dozlarda toksisite ve etik kuralları dahilinde sahip olduğu bazı engeller mevcuttur. Eksozomların ise, hücre uygulamalarına kıyasla daha güvenilir olabileceği düşünülmektedir (Tan vd., 2024).

Eksozomlar, farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılarak terapötik ajanlarla yüklenebilirler (Ahmed vd., 2024). Tez çalışmasında tercih edilen parental hücre inkübasyonu; hücrenin eksozom biyosentez yolağını kullanarak endositoz ile hücre içine alınan malzemenin eksozomlara yüklenmesine imkan sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemde malzemenin yükü, içeriği, boyutu ve hücre ile etkileşimi yükleme kapasitesini doğrudan etkilemektedir. Bu yöntemin sağladığı avantajlar arasında, eksozom membran bütünlüğünün korunması, izolasyon sonrasında yüklenmeyen malzeme pürifikasyonuna ihtiyaç duyulmaması sayılabilir. Ancak dezavantaj olarak; malzeme sitoksisitesi, yükleme kapasitesinin azlığı ve kontrolsüzlüğü söz konusu olabilmektedir (Fu vd., 2020).

Eksozom izolasyon yöntemi olarak seri ultrasantrifüj tekniği tercih edilmiştir. Eksozomların, değişen boyutlarında içerik farklılıkları olduğu bilinmektedir ve ultrasantrifüj ile izole edilen eksozom popülasyonunda heterojenite yüksektir (Kalluri & LeBleu, 2020). Şayet eksozom içeriğinin önem arz ettiği bir çalışma dizayn ediliyorsa, daha saf eksozom popülasyonlarının eldesi için, kromatografi gibi tekniklerin tercih edilmesinin daha güvenilir olacağı düşünülmektedir (Krylova & Feng, 2023).

Eksozomlar, proteinler de dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküller içerir. BCA analizi, protein konsantrasyonunu ölçmek için güvenilir ve hassas bir yöntem olduğundan eksozomların miktar tayini için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem, protein içeriğine dayalı olarak eksozom miktarı hakkında bilgi sağlarken, eksozom sayısı veya saflıkları hakkında doğrudan bilgi vermez (Şekil 3.17.). Hücrelerin pasaj numarası, stres durumu ve uygulama koşulları göz önüne alındığında eksozomlardaki protein miktarı değişkenlik gösterebilir (Kumar vd., 2024). Bu sebeple; tekrarlanabilir standartlar için, özellikle klinik uygulamalarda veya hassas çalışmalarda, NTA gibi parçacık dağılımı ve konsantrasyonunu belirleyebilen yöntemlerin tercih edilmesinin daha güvenilir olacağı düşünülmektedir.

Eksozomlardaki Chl-CD varlığını tespit edebilmek için farklı teknikler denenmiştir. Standard TEM görüntülemesinde, eksozom morfolojisini görünür kılmak için kullanılan kontrast boyasının (UA) varlığı, metalik kontrastı düşük, boyutları 2-3 nm olan Chl-CD' ların tespitini güçleştirmiştir. Bu sebeple, Chl-CD' ların içeriğindeki Bakır' ın varlığından faydalanılmıştır. STEM-EDX analizinde, CD@$EXO_{MKH}$ örneklerinde Bakır sinyalleri yakalanabilmiştir (Şekil 3.19.). Ayrıca, HR-TEM görüntülemesinden yakalanan Chl-CD' ların kristal yapısının varlığı, örnek içinde Chl-CD' ların varlığını işaret etmektedir (Şekil 3.20.). Ancak, her iki teknikte de yüksek vakuma maruz kalan eksozomların morfolojilerini korumak zor olduğu için, Chl-CD' ların eksozom içinde mi, yüzeyinde mi yoksa serbest halde mi olduğu hakkında yorum yapabilmek oldukça güçtür. Floresansı düşük, metal içeriği olmayan ve ilaç konjugasyonu yapılmamış karbon bazlı nanomalzemelerin hücre, doku veya organ gibi biyolojik örnekler içindeki varlığını tespit etmek oldukça zordur. Bu engeli aşmak için, RAMAN, AFM ve Kütle Spektrometrisi gibi kimyasal bağ enerjileri veya iyon yoğunluklarını analiz edebilen teknolojilerden faydalanmak mümkündür. Bu teknikler, malzemenin hücre veya doku içindeki dağılımları hakkında ayrıntılı bilgi sağlayabilmektedir (S. Chen vd., 2015), (Lamprecht vd., 2012).

Serbest Chl-CD ile, biyolojik örnek içindeki Chl-CD' dan alınan floresan spektrumları farklılık gösterebilir. Tez çalışmasında serbest Chl-CD ile inkübe edilen hücrelerin internalizasyon değerlendirmelerinde, Akış Sitometri cihazında en yüksek floresan yoğunluğu APC kanalından alınmıştır. Ancak Chl-CD taşıyan eksozomlarla inkübe edilen hücrelerde en yoğun floresan ölçümü Qdot 655 kanalından kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra nanomalzemelerin floresan stabilitesi, absorbanstan farklı olarak, saklama koşullarına, süresine, deney prosedürüne göre değişkenlik gösterebilmektedir. Serumlu besiyeri içinde uzun süreli inkübasyon, Chl-CD' ların floresan yoğunluğunda ya da spektrumunda kaymalara sebebiyet verebilir ve aynı zamanda artan konsantrasyonlarda floresan yoğunluğu lineer olarak artış göstermeyebilir (Cherkas vd., 2018). Dolayısı ile eksozom yükleme kapasitesi için floresan özelliğinden faydalanmak yanıltıcı olabilir. Floresan ölçümü, absorbansa göre daha hassas bir teknik olarak kabul edilse de, absorbans; molekülün kimyasal yapısında anlamlı bir değişiklik olmadığı sürece stabildir (Alghourani vd., 2020). Tekrarlanabilir sonuçlar için, kantitatif ölçümlerde absorbans değerinin daha güvenilir olacağı düşünülmüştür. Bu sebeple, eksozomlara yüklenen Chl-CD miktarının hesaplanmasında, Chl-CD' ların karakteristik absorbans pikinden faydalanılmıştır. Aynı şekilde; eksozomlar aracılığı ile kanser hücrelerine taşınan Chl-CD miktarını değerlendirmek için, malzemenin floresan özelliğinden faydalanmanın, yeterince hassas bir yöntem olmayacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra,

ekstra bir boyama veya konjugasyona gerek duyulmaksızın, eksozomların kanser hücrelerine internalizasyonu, bir diğer ifadeyle, Chl-CD'lerin eksozomlar aracılığı ile hücrelere taşınımını Akış Sitometrisi ile değerlendirmenin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Eksozomların kanser hücrelerindeki etkisi tartışmalıdır. Eksozom kaynağına ve alıcı hücre tipine göre tümörojenik ya da anti-tümörojenik yanıtlar olasıdır (Abbasi-Malati vd., 2024). Taşımakta oldukları biyomolekül miktarına bağlı olarak, alıcı hücredeki dengeleri değiştirmesi ile farklı yolakları modüle edebilir. Bu sebeple uygulanan eksozom konsantrasyonu oldukça kritiktir (Dhanu Gupta vd., 2021). Chl-CD'lerin yüksek dozlarda dahi sitotoksik etkisinin düşük olduğu gözlenmiştir. Eksozomlar aracılığıyla taşınan Chl-CD miktarının oldukça düşük olması, artan hedefleme kapasitesi ile biyodağılım kontrolsüzlüğünün ve dolayısıyla yan etkilerin minimalize edilebileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, Chl-CD'lerin terapötik etki gösterebileceği miktar ve aynı zamanda eksozomların risk oluşturmayacağı konsantrasyon dengesinin yakalanması için çok sayıda optimizasyon çalışması gerekmektedir.

Eksozom aracılı PDT uygulamasında, glioblastoma hücre hatlarında CD@$EXO_{MKH}$ + Işık gruplarında anlamlı derece hücre ölümü kaydedilmiştir (Şekil 3.27.). Ancak ilginç olan, A549 hücrelerinde Chl-CD içermeyen $EXO_{MKH}$ + Işık gruplarında da hücresel ölümün kaydedilmiş olmasıdır. Proteinlerin ışık uyarımı ile konfigürasyonlarının değişebileceği ve farklı biyomoleküller ile dimerizasyonunun uyarılabileceği bilinmektedir (Dagliyan & Hahn, 2019). Işığın bu etkisi, hücre içi protein sentez ve aktivasyon mekanizmalarını etkileyebilir (Tischer & Weiner, 2014). Bu bilgi ışığında; eksozomlarla taşınan biyomoleküller, A549 hücrelerinde ışığa maruz kaldıklarında bu ve benzeri aktivasyonlar dahilinde hücre içi moleküllerle etkileşim içinde bulunuyor olabilir. Diğer bir bakışta ise; bu durumun A549 hücrelerine spesifik olmayıp, glioblastoma hücrelerinde de gerçekleşiyor, ancak; glioblastoma hücrelerinde devreye giren direnç mekanizmaları ile baskılanıyor olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasının hipotezinde, eksozomlar aracılığı ile taşınan Chl-CD' ların PDT etkisinin artacağı öngörülmüştür. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, yaklaşık 40 kat daha az Chl-CD kullanılarak serbest malzeme kullanımında elde edilen hücre ölümüne ulaşılabildiği görülmüştür. Benzer şekilde; Kim ve ark., PTX'in eksozomlar aracılığı ile 30 kat daha fazla hücrelere taşındığını ve 50 kat daha fazla sitotoksik etki sağladığını iddia etmiştir. Bu artışın, eksozomların Pgp aracılı ilaç kusma mekanizmasını baypas edebilmesinin

bir sonucu olduğu öngörülmüştür (M. S. Kim vd., 2016). Pan ve ark. ‘ nın yapmış olduğu çalışmada ise; aynı miktarda nanomalzeme ile uygulanan PDT’ de hücre canlılığının; serbest uygulamaya kıyasla, eksozom aracılı gruplarda % 50’ lerden % 25’ lere kadar gerilediği gösterilmiştir (Pan vd., 2020). Lara ve ark.; eksozomlarla taşınan nanomalzeme internalizasyonunda 4,5 kat artış olduğunu ifade etmiştir (Lara vd., 2020). Eksozom aracılı terapinin, serbest malzeme uygulamasına göre daha efektif sonuçlanmasının altında farklı mekanizmalar yatıyor olabilir. Heath ve arkadaşları, eksozomların endozomal kaçış yeteneklerinin bu etkiyi arttırdığını iddia etmişlerdir (Heath vd., 2019). Farklı araştırmalar ise, eksozomların intraselüler trafiği değiştirdiğine ve P-gp gibi ilaç atım mekanizmalarını baypas ederek hücre içi akümülasyonu arttırdığına dikkat çekmektedir (C. Zhao vd., 2024), (M. S. Kim vd., 2016). Eksozom aracılığıyla taşınan Chl-CD’ ların PDT etkisindeki artışın altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılabilmesi için, omik analizlerin faydalı olabileceğine inanılmaktadır.

Karbon Dot’ ların yüzey özellikleri ve boyutlarının KBB’yi geçebilmeye elverişli olduğu, literatürde sıkça vurgulanmaktadır (S. Yang vd., 2023), (Seven vd., 2021). Zhang ve arkadaşları, Alzheimer hastalığında kullanılan terapötik bir ilacın, CD konjugasyonu sayesinde rahatlıkla beyin dokuya ulaşabildiğini ve bu sayede tedavi başarısını arttırdığını göstermiştir (W. Zhang vd., 2022). Serbest Chl-CD’ ların *in vivo* biyodağılımları incelendiğinde, beyin dokuda birikim sağladığı görülmüştür (Şekil 3.29.). Chl-CD’ların intrinsik floresan özelliği sayesinde, özellikle beyin gibi ulaşılması zor dokularda, görüntüleme sistemlerinde ve aynı zamanda, ilaç konjugasyonu ile terapötik yaklaşımlarda umut vadeden bir potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Eksozomların *in vivo* biyodağılımlarını takip edebilmek için PKH26, DID, DIO gibi farklı floresan boyamaları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu boyamaların eksozom takibinde sağladığı avantajların yanı sıra, fazla boya kalıntılarını uzaklaştırmak oldukça sıkıntılı bir süreçtir. Eksozomlardan, ayırt edilmesi neredeyse imkansız olan boyut ve floresan yoğunluğuna sahip olabilirler (Pužar Dominkuš vd., 2018). Burada; ekstra bir boyama ve pürifikasyon basamağına gerek duyulmaksızın, eksozomların ve dolayısı ile Chl-CD’ ların biyodağılımını IVIS sisteminde takip edebilmenin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Karbon Dot taşıyan eksozomların ($CD@EXO_{MKH}$) yoğun şekilde tümör dokuda birikim gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 3.30.). Serbest Chl-CD uygulamasıyla karşılaştırıldığında, eksozom aracılı PDT' de daha az doz ve uygulama sayısı ile başarılı bir tedavi sonucu alınmıştır. Feng ve ark.'nın gerçekleştirdiği bir çalışmada, eksozom aracılığıyla taşınan malzemenin, serbest malzemeye kıyasla yaklaşık 1.9 kat daha fazla tümör birikimi sağladığı belirtilmiştir. Foto Dinamik Terapi başarısındaki artışın, daha fazla malzemenin dokuya ulaşmasıyla ilişkili olduğu vurgulanmıştır (Feng vd., 2023). Tanziela ve arkadaşları, eksozom aracılı terapilerdeki başarıyı, eksozomların alıcı hücrelerdeki reseptörleri hedef alarak yük taşıma verimliliğini artırabilmeleri, zorlu inflamatuvar ortamlarda direnç göstermeleri, dolaşımda uzun süre aktif kalmaları ve derin tümör doku penetrasyonu kabiliyetleri ile açıklamaktadır (Tanziela vd., 2020). Eksozomların, tümör dokudaki Chl-CD birikimine katkı sağladığına ve istenmeyen biyodağılımı minimalize ederek güvenli ve etkili bir tedavinin zeminini oluşturduğuna inanılmaktadır. Eksozom ve Chl-CD üzerinde gerçekleştirilecek modifikasyonlarla, hücre ya da organel hedefleme kapasiteleri arttırılarak, tedavi veriminin arttırılabileceği düşünülmektedir.

Gerek serbest Chl-CD gerekse eksozom aracılı PDT uygulamalarında doku ve organlarda herhangi bir hasar, lezyon veya nanomalzeme birikimi gözlenmemiştir (Şekil3.33. ve Şekil 3.34.). Ancak Chl-CD' ların düşük kontrastları ve küçük boyutları gereği, olası bir doku birikiminde, histolojik kesitlerde CD tespiti güç olabilir (Michael vd., 2021), (Y. Zhang vd., 2014). Biyodağılım sonuçları incelendiğinde, Chl-CD'lerin ve eksozom aracılı taşıma sisteminin biyouyumlu ve güvenilir olduğu düşünülmektedir. Ancak, nanomalzemelerin histopatolojik etkilerinin değerlendirilmesi için spesifik boyamalar ve biyokimya analizlerinin daha güvenilir sonuçlar sağlayacağı öngörülmektedir (Kazaryan vd., 2022).

Son yıllarda Karbon Dot' lar, kanser çalışmalarında oldukça tercih edilmeye başlamıştır. Floresan özellikleri ile görüntüleme sistemlerinde, foto katalitik karakterleri ile terapide, boyut ve yüzey özellikleri ile ilaç taşıma sistemlerine ümit verici avantajlar sunarlar (Jing vd., 2024). Karbon Dot' ların biyolojik sistemlerde tespiti zorlayıcı olabilmektedir. Bu nedenle, literatürdeki çalışmalarda genellikle bir ilaç ya da metalik element konjugasyonu ile kullanımın öne çıktığı görülmektedir.

Li ve arkadaşları, eksozomlara yüklenen Boron (Br) taşıyan Karbon Dot (BrCD)' ların Nötron Yakalama Radyasyon terapisindeki terapötik etkisinin arttığını göstermiştir. Aynı çalışmada, BrCD yüklenen makrofaj kaynaklı eksozomların KBB' ini geçerek U87 hücrelerine internalize oldukları gösterilmiştir. Tümör dokudaki Br akümülasyonu ICP-MS analizi ile ölçülmüştür. Çalışmada, eksozomların BrCD taşımadaki güçlü katkısı ve mükemmel tedavi yeteneği vurgulanmıştır (J. Li vd., 2021). Tiwari ve ark. ise; kemoterapötik bir ilaç olan Dekarbazin (DC)' i CD' lara bağladıktan sonra (DCCD), sonikasyon ile meme kanseri kaynaklı eksozomlara yüklemişlerdir. Yüklenme kapasitesi HPLC ile değerlendirilmiştir. Dekarbazin; suda çözünürlüğü zayıf, stabilizasyonu düşük ve biyolojik sistemlerde yarı ömrü kısa bir ilaçtır. Dekarbazin' in CD konjugasyonu sayesinde, suda çözünürlüğü ve fotostabilitesi arttırılmıştır. Çalışmada; DCCD' ların eksozomlara yüklenmesi ile meme tümöründeki birikim kapasitesinin 4,5 kat arttığı ve terapötik etkinin yükseldiği vurgulanmıştır (Tiwari vd., 2024). Xiang ve ark. gerçekleştirdiği çalışmada; Bakır iyonu bağladıkları CD' ları ukMKH' lerinden elde edilen apoptotik veziküllere yüklemişlerdir. Bu çalışmada diğerlerinden farklı olarak; CD yüklü apoptotik veziküllerin, karaciğeri hedefleyerek sepsise karşı makrofaj aracılı antibakteriyel etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (Xiang vd., 2024).

Literatürde, CD yüklü eksozomlarla ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu tez çalışmasıyla birlikte, CD' ların eksozom aracılığıyla gerçekleştirdiği PDT etkisine ilişkin bulgular, literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Yapılan çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, CD yüklü eksozomların klinik çalışmalarda güvenli, etkili ve uygulaması kolay bir tedavi seçeneği sunma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

# 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, nanomalzeme temelli görüntüleme ve terapi yaklaşımlarında eksozomların katkısı araştırılmıştır. Model malzeme olarak, karbon bazlı bir nanomalzeme olan, Chl-CD tercih edilmiştir. Klorofil öncül maddesinden sentezlenen Chl-CD'lar, ekstra bir florokrom konjugasyonuna ihtiyaç duyulmaksızın kendi floresan karakterleriyle biyogörüntülemede, fotokatalitik özellikleriyle terapi yaklaşımlarında oldukça başarılı sonuçlar sunmaktadır.

Karbon Dot'lar ekstra küçük boyutları, biyouyumlulukları ve fizikokimyasal özellikleriyle teranostik yaklaşımlarda umut vadetmektedir. Ancak, sağladıkları avantajların yanı sıra henüz aydınlatılmayı bekleyen birçok yönü vardır. Hücre internalizasyon mekanizmaları, intraselüler yolculuğu ve terapötik etkisinin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında bilgiler oldukça yetersizdir. Biyolojik sistemlere uyumlu olduğuna dair veriler literatürde yer alsa da klinik seviyede kullanımı için; Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon (ADME) çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Yüzey modifikasyonları, prekürsör kaynak çeşitliliği ve üretim tekniklerindeki yenilikçi yaklaşımlarla, nanomalzeme bilimi her geçen gün gelişim göstermektedir. Bu noktada CD üretiminin ölçek arttırma ve standardizasyon çalışmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır. Laboratuvar ölçekli üretimlerde, partiler arası varyasyonlar sıklıkla karşılaşılan problemler arasındadır. Bununla birlikte; CD' ların hem optik özelliklerinin hem de hedef belirleme kapasitelerinin güçlendirilmesi, teranostik potansiyelini arttıracaktır.

Foto Dinamik Terapi başarısını etkileyen en kritik unsurlardan biri, malzemenin hücre içinde ya da tümör dokuda birikiminin artmasıdır. Bu amaçla, malzeme yüzeyine hedefe spesifik ligandların eklenmesi ya da taşıyıcı bir sistemle desteklenmesi, tedavi güvenliğini ve etkisini artırmada önemli bir rol oynayabilir. Eksozomlar, biyolojik kökenleri, hedef belirleme kapasiteleri, biyoaktif içerikleri ve daha birçok eşsiz özelliğiyle terapi, teşhis ve ilaç taşıma sistemlerinde adeta altın standartlarda değerlendirilmektedir. Tez çalışmasında, eksozomların Chl-CD' lar için iyi bir taşıyıcı adayı olabileceğini destekler nitelikte sonuçlar sunulmuştur.

Eksozom sentezi, salınımı, terapötik etkisi ve taşıyıcı yetenekleri üzerine yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak; taşımakta oldukları kargonun kaderi hakkında bilgiler literatürde yeterizdir. Alıcı hücre tarafından hücre içine alınan eksozomların, içeriğini aktif şekilde sitoplazmaya bırakıp bırakmadığı, salınan içeriğin fonksiyonel olarak aktifliğini koruyup koruyamadığı ve hücre içindeki spesifik lokalizasyonu üzerine yapılan çalışmalar arttırılmalıdır. Eksozomlar, içeriklerini alıcı hücreye verdikten sonra kargo, ekzositoz ile hücre dışına salınabilir, hücre içinde degredasyona uğrayabilir ya da yeniden eksozomlara yüklenerek salgılanabilir. Böyle bir olası durumda eksozomun donör hücresi değişmiş olacaktır ve o kargo için, yeni hedeflere doğru beklenmedik bir yolculuğun başlaması söz konusu olabilir.

Eksozomların biyolojik içerikleri, her ne kadar onları eşsiz kılsa da kullanım alanlarında riskleri de beraberinde getirmektedir. Eksozomlar, taşıdıkları proteinler ve miRNA'lar sayesinde alıcı hücrede birçok hücresel mekanizmaya dahil olabilirler. Eksozomla taşınan bir kargonun alıcı hücrede beklenmedik bir etkileşime girmesi nedeniyle moleküler bir mekanizmanın bozulması da olasıdır. Bu noktada, eksozomların heterojen bir popülasyon olduğu göz önünde bulundurulması gereken bir durumdur.

Eksozomlar, donör hücrelerinin karakterini yansıtır. Bu, ne kadar eksozom içeriği ve davranışı hakkında yol gösterici olsa da hücredeki herhangi bir stres ya da patoloji durumu eksozomları direkt olarak etkileyecektir. Dolayısı ile; eksozomların salgılanma miktarı, içeriği, hedefi ve hedef hücrede dahil olacağı mekanizmalar değişkenlik gösterecektir. Bu sebeple, eksozom çalışmalarında standardizasyon oldukça hassas bir konudur.

Terapötik ajan taşıma stratejilerinde eksozomlar oldukça umut vaadeden biyolojik araçlar arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, eksozomların yükleme kapasitesi ve üretim süreçleri ile ilgili bazı zorluklar söz konusudur. Parental hücre inkübasyonuna dayalı yükleme tekniğinde yükleme kapasitesi, büyük ölçüde kullanılan hücre tipine bağlıdır. Endozomal yolakların hedeflenmesi yoluyla bu kapasitenin artırılması mümkündür, ancak bu yaklaşım, hücre ya da taşıyıcı malzeme üzerinde müdahalelerde bulunmayı gerektirdiğinden deneysel süreçlerde sapmalara yol açabilmektedir. Sonikasyon, elektroporasyon gibi aktif yükleme teknikleri, eksozomlara malzeme yükleme kapasitesini arttırmak için tercih edilen diğer yöntemler arasındadır. Bu gibi yaklaşımlarda eksozomların membran bütünlüğünde meydana gelebilecek deformasyonlar ve agregasyon eğilimleri göz önünde bulundurulmalıdır. Klinik boyutta eksozom üretimi için hem miktar hem kalite sistemi, seçilen yükleme tekniği ile

entegrasyonu ekstra bir kontrol mekanizması gerektirecektir. Bu sebeple, eksozom üretim ve yükleme kapasitelerinin standardizasyonuna yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Araştırmalar, ilaç veya nanomalzeme yüklü eksozomların terapötik etkinliği artırdığına dair veriler sunmaktadır. Bu çalışmada, Chl-CD yüklü MKH eksozomlarının PDT üzerindeki etkisi incelenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda, eksozomların Chl-CD taşınımını ve terapötik etkinliğini artırdığı söylenebilir. Ancak, Chl-CD'ların moleküler mekanizmalarla etkileşimleri ve uzun vadeli etkileri üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Ayrıca, malzeme taşıyan eksozomların biyolojik sisteme dahil edildikten sonraki süreçlerinin de takip edilmesi, uygulama güvenliliği ve etkililiği açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın bulguları, Chl-CD'ların kanser tanı ve tedavi yaklaşımlarında umut vadeden bir potansiyel taşıdığını göstermektedir. Özellikle eksozomlar gibi biyolojik taşıyıcı sistemlerle entegrasyonu, Chl-CD' ların hedefleme kabiliyetini ve tedavi etkinliğini artırarak heyecan verici sonuçlar sunmaktadır. Gelecekteki araştırmalar, Chl-CD' ların biyolojik sistemlerle olan etkileşiminin detaylandırılması ve klinik kullanımını optimize etmek amacıyla yeni modifikasyon teknikleri ve üretim stratejilerine odaklanmalıdır. Nanomalzeme taşıyan eksozomların terapötik etkisi fonksiyonel olarak gösterilmiş olsa da altta yatan mekanizmaların aydınlatılması için, sonuçların moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Chl-CD yüklü eksozomların PDT ajanı olarak kullanılması, hastaların yaşam kalitesini arttırma potansiyeline sahiptir. Bu doğrultuda, multidisipliner çalışmalar ve klinik araştırmalar, terapötik etkinliğin ve güvenliliğin doğrulanması için kritik bir öneme sahiptir.

# KAYNAKLAR


Abbasi-Malati, Z., Azizi, S. G., Milani, S. Z., Serej, Z. A., Mardi, N., Amiri, Z., Sanaat, Z., & Rahbarghazi, R. (2024). Tumorigenic and tumoricidal properties of exosomes in cancers; a forward look. *Cell Communication and Signaling*, *22*(1), 130. https://doi.org/10.1186/s12964-024-01510-3

Abedi, M., Hajinejad, M., Atabi, F., & Sahab-Negah, S. (2022). Exosome Derived from Human Neural Stem Cells Improves Motor Activity and Neurogenesis in a Traumatic Brain Injury Model. *BioMed Research International*, *2022*, 6409346. https://doi.org/10.1155/2022/6409346

Abello, J. F., Nguyen, T. D. T., Marasini, R., Aryal, S., & Weiss, M. L. (2019). Biodistribution of gadolinium- and near infrared-labeled human umbilical cord mesenchymal stromal cell-derived exosomes in tumor bearing mice. *Theranostics*, *9*, 2325–2345. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:145954426

Adamiak, M., Cheng, G., Bobis-Wozowicz, S., Zhao, L., Kedracka-Krok, S., Samanta, A., Karnas, E., Xuan, Y.-T., Skupien-Rabian, B., Chen, X., Jankowska, U., Girgis, M., Sekula, M., Davani, A., Lasota, S., Vincent, R. J., Sarna, M., Newell, K. L., Wang, O.-L., … Zuba-Surma, E. K. (2018). Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair Than iPSCs. *Circulation Research*, *122*(2), 296–309. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311769

Aebisher, D., Woźnicki, P., & Bartusik-Aebisher, D. (2024). Photodynamic Therapy and Adaptive Immunity Induced by Reactive Oxygen Species: Recent Reports. *Cancers*, *16*(5), 967. https://doi.org/10.3390/cancers16050967

Agudiez, M., Martinez, P. J., Martin-Lorenzo, M., Heredero, A., Santiago-Hernandez, A., Molero, D., Garcia-Segura, J. M., Aldamiz-Echevarria, G., & Alvarez-Llamas, G. (2020). Analysis of urinary exosomal metabolites identifies cardiovascular risk signatures with added value to urine analysis. *BMC Biology*, *18*(1), 192. https://doi.org/10.1186/s12915-020-00924-y

Ahmed, W., Mushtaq, A., Ali, S., Khan, N., Liang, Y., & Duan, L. (2024). Engineering Approaches for Exosome Cargo Loading and Targeted Delivery: Biological versus Chemical Perspectives. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.4c00856

Akbari, A., Nazari-Khanamiri, F., Ahmadi, M., Shoaran, M., & Rezaie, J. (2023). Engineered Exosomes for Tumor-Targeted Drug Delivery: A Focus on Genetic and Chemical Functionalization. Içinde *Pharmaceutics* (C. 15, Sayı 1). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010066

Al-Awsi, G. R. L., Alsaikhan, F., Margiana, R., Ahmad, I., Patra, I., Najm, M. A. A., Yasin, G., Rasulova, I., Hammid, A. T., Kzar, H. H., Al-Gazally, M. E., & Siahmansouri, H. (2023). Shining the light on mesenchymal stem cell-derived exosomes in breast cancer. *Stem Cell Research & Therapy*, *14*(1), 21. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03245-3

Alghourani, K. M. K., Bachir, W., & Karraz, G. (2020). Effect of Absorption and Scattering on Fluorescence of Buried Tumours. *Journal of Spectroscopy*, *2020*(1), 8730471. https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2020/8730471

Alhasan, A. H., Patel, P. C., Choi, C. H. J., & Mirkin, C. A. (2014). Exosome Encased Spherical Nucleic Acid Gold Nanoparticle Conjugates as Potent MicroRNA Regulation Agents. *Small*, *10*(1), 186–192. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.201302143

Almeida, M. T. M., Sušnik, E., Drašler, B., Taladriz-Blanco, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding Nanoparticle Endocytosis to Improve Targeting Strategies in Nanomedicine. *Chemical Society Reviews*. https://doi.org/10.1039/d0cs01127d

Altanerova, U., Babincova, M., Babinec, P., Benejova, K., Jakubechova, J., Altanerova, V., Zduriencikova, M., Repiska, V., & Altaner, C. (2017). Human mesenchymal stem cell-derived iron oxide exosomes allow targeted ablation of tumor cells via magnetic hyperthermia. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 7923–7936. https://doi.org/10.2147/IJN.S145096

Aniogo, E. C., George, B. P., & Abrahamse, H. (2021). Molecular Effectors of Photodynamic Therapy-Mediated Resistance to Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13182. https://doi.org/10.3390/ijms222413182

Asghar, M. A., & Asghar, M. A. (2020). Green Synthesized and Characterized Copper Nanoparticles Using Various New Plants Extracts Aggravate Microbial Cell Membrane Damage After Interaction With Lipopolysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, *160*, 1168–1176. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.198

Bai, Z., Zhao, L., Feng, H., Xin, Z., Wang, C., Liu, Z., Tian, M., Zhang, H., Bai, Y., & Feng, F. (2023). Aptamer Modified Ti3C2 Nanosheets Application in Smart Targeted Photothermal Therapy for Cancer. *Cancer Nanotechnology*. https://doi.org/10.1186/s12645-023-00189-4

Baranyai, E., Tóth, C. N., & Fábián, I. (2020). Elemental Analysis of Human Blood Serum by Microwave Plasma—Investigation of the Matrix Effects Caused by Sodium Using Model Solutions. *Biological Trace Element Research*, *194*(1), 13–23. https://doi.org/10.1007/s12011-019-01743-1

Barbora, A., Bohar, O., Sivan, A. A., Magory, E., Nause, A., & Minnes, R. (2021). Higher pulse frequency of near-infrared laser irradiation increases penetration depth for novel biomedical applications. *PLOS ONE*, *16*(1), e0245350. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245350

Bozyk, N., Tang, K. D., Zhang, X., Batstone, M., Kenny, L., Vasani, S., & Punyadeera, C. (2023). Salivary exosomes as biomarkers for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology Reports*, *6*, 100017. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.oor.2023.100017

Bu, W., Xu, X., Wang, Z., Jin, N., Liu, L., Liu, J., Zhu, S., Zhang, K., Jelinek, R., Zhou, D., Sun, H., & Yang, B. (2020). Ascorbic Acid-PEI Carbon Dots with Osteogenic Effects as miR-2861 Carriers to Effectively Enhance Bone Regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*(45), 50287–

50302. https://doi.org/10.1021/acsami.0c15425

Bustamante, V., & Palavecino, C. E. (2023). Effect of Photodynamic Therapy on Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii: A Scoping Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *43*, 103709. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2023.103709

Cao, J.-J., Zhang, M.-S., Li, X.-Q., Yang, D.-C., Xu, G., & Liu, J.-Y. (2020). A glutathione-responsive photosensitizer with fluorescence resonance energy transfer characteristics for imaging-guided targeting photodynamic therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *193*, 112203. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112203

Cao, X., Xue, L., Yu, X., Yan, Y., Lu, J., Luo, X., Wang, H., & Wang, J. (2024). Myogenic Exosome miR-140-5p Modulates Skeletal Muscle Regeneration and Injury Repair by Regulating Muscle Satellite Cells. *Aging*. https://doi.org/10.18632/aging.205617

Cao, Y., Wu, T., Zhang, K., Meng, X., Dai, W., Wang, D., Dong, H., & Zhang, X. (2019). Engineered Exosome-Mediated Near-Infrared-II Region V 2 C Quantum Dot Delivery for Nucleus-Target Low-Temperature Photothermal Therapy [Research-article]. *ACS Nano*, *13*, 1499–1510. https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07224

Casas, A., Venosa, G. Di, Hasan, T., & Batlle, A. (2011). Mechanisms of Resistance to Photodynamic Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, *18*(16), 2486–2515. https://doi.org/10.2174/092986711795843272

Chang, Q., Wang, P., Zeng, Q., & Wang, X. (2024). A review on ferroptosis and photodynamic therapy synergism: Enhancing anticancer treatment. *Heliyon*, *10*(7), e28942. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28942

Chatterjee, P., & Dhibar, S. (2023). Nanomaterial Marvels: Pioneering Applications and Cutting-Edge Advancements in Drug Delivery. *Nano and Medical Materials*, *3*(2), 220. https://doi.org/10.59400/nmm.v3i2.220

Chen, M., Li, Y., Ma, N., & Zang, J. (2022). Mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with 5-Fu against cholangiocarcinoma in vitro. *Mol Med Rep*, *25*(6), 213. https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12729

Chen, S., Xiong, C., Liu, H., Wan, Q., Hou, J., He, Q., Badu-Tawiah, A., & Nie, Z. (2015). Mass spectrometry imaging reveals the sub-organ distribution of carbon nanomaterials. *Nature Nanotechnology*, *10*(2), 176–182. https://doi.org/10.1038/nnano.2014.282

Chen, Y., Zhao, Y., Yin, Y., Jia, X., & Mao, L. (2021). Mechanism of cargo sorting into small extracellular vesicles. *Bioengineered*, *12*(1), 8186–8201. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1977767

Chen, Z., Xiong, M., Tian, J., Song, D., Duan, S., & Zhang, L. (2024). Encapsulation and Assessment of Therapeutic Cargo in Engineered Exosomes: A Systematic Review. *Journal of Nanobiotechnology*. https://doi.org/10.1186/s12951-023-02259-6

Cheng, Zesheng, Que, H., Chen, L., Sun, Q., & Wei, X. (2022). Nanomaterial-Based Drug Delivery System Targeting Lymph Nodes. *Pharmaceutics*. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071372

Cheng, Zhe, Li, M., Dey, R., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1), 85. https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0

Cherkas, V., Grebenyuk, S., Osypenko, D., Dovgan, A. V, Grushevskyi, E. O., Yedutenko, M., Sheremet, Y., Dromaretsky, A., Bozhenko, A., Agashkov, K., Kononenko, N. I., & Belan, P. (2018). Measurement of intracellular concentration of fluorescently-labeled targets in living cells. *PLOS ONE*, *13*(4), e0194031. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194031

Christodoulou, I., Goulielmaki, M., Devetzi, M., Panayiotidis, M. I., Κολιάκος, Γ., & Zoumpourlis, V. (2018). Mesenchymal Stem Cells in Preclinical Cancer Cytotherapy: A Systematic Review. *Stem Cell Research & Therapy*. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1078-8

Chu, S., Shi, X., Tian, Y., & Gao, F. (2022). pH-Responsive Polymer Nanomaterials for Tumor Therapy. *Frontiers in Oncology*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.855019

Cojocaru, F.-D., Botezat, D., Gardikiotis, I., Uritu, C. M., Dodi, G., Trandafir, L. M., Rezuş, C., Rezuş, E., Tamba, B. I., & Mihai, C. T. (2020). Nanomaterials Designed for Antiviral Drug Delivery Transport Across Biological Barriers. *Pharmaceutics*. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020171

Crucitta, S., Cucchiara, F., Mathijssen, R. H. J., Mateo, J., Jager, A., Joosse, A., Passaro, A., Attili, I., Petrini, I., Schaik, R. van, Danesi, R., & Re, M. Del. (2022). Treatment-Driven Tumour Heterogeneity and Drug Resistance: Lessons From Solid Tumours. *Cancer Treatment Reviews*, *104*, 102340. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102340

Dagliyan, O., & Hahn, K. M. (2019). Controlling protein conformation with light. *Current Opinion in Structural Biology*, *57*, 17–22. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.01.012

Değirmenci, N. S., Uslu, M., Kırbaş, O. K., Şahın, F., & Uçar, E. Ö. (2022). Lapatinib Loaded Exosomes as a Drug Delivery System in Breast Cancer. *SSRN Electronic Journal*. https://doi.org/10.2139/ssrn.4067203

Dias, L. M., Sharifi, F., de Keijzer, M. J., Mesquita, B., Desclos, E., Kochan, J. A., de Klerk, D. J., Ernst, D., de Haan, L. R., Franchi, L. P., van Wijk, A. C., Scutigliani, E. M., Cavaco, J. E. B., Tedesco, A. C., Huang, X., Pan, W., Ding, B., Krawczyk, P. M., & Heger, M. (2021). Attritional evaluation of lipophilic and hydrophilic metallated phthalocyanines for oncological photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *216*, 112146. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112146

Ding, Y., Cao, F., Sun, H., Wang, Y., Liu, S., Wu, Y., Cui, Q., Mei, W., & Li, F. (2019). Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells deliver exogenous miR-145-5p to

inhibit pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Cancer Letters*, *442*, 351–361. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.10.039

Dong, C., Yi, Q., Fang, W., & Zhang, J. (2023). A mini review of nanomaterials on photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, *54*, 100568. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2022.100568

Drobiova, H., Sindhu, S., Ahmad, R., Haddad, D., Al-Mulla, F., & Al Madhoun, A. (2023). Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells: A Concise Review of Their Secretome and Prospective Clinical Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217

Düzgüneş, N., Piskorz, J., Skupin-Mrugalska, P., Yıldırım, M., Sessevmez, M., & Cheung, J. (2023). Photodynamic Therapy of Oral Cancer and Novel Liposomal Photosensitizers. *Oral*, *3*(3), 276–294. https://doi.org/10.3390/oral3030023

Ebrahimkhani, S., Vafaee, F., Young, P. E., Hur, S. S. J., Hawke, S., Devenney, E., Beadnall, H., Barnett, M. H., Suter, C. M., & Buckland, M. E. (2017). Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status. *Scientific Reports*, *7*(1), 14293. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14301-3

Ejigah, V., Owoseni, O., Bataille-Backer, P., Ogundipe, O. D., Fisusi, F. A., & Adesina, S. K. (2022). Approaches to Improve Macromolecule and Nanoparticle Accumulation in the Tumor Microenvironment by the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Polymers*. https://doi.org/10.3390/polym14132601

Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, *11*(1), 108. https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-108

Etefa, H. F., Tessema, A. A., & Dejene, F. B. (2024). *Carbon Dots for Future Prospects: Synthesis, Characterizations and Recent Applications: A Review (2019–2023)*. https://doi.org/10.20944/preprints202404.0245.v1

Fan, D., Cao, Y., Cao, M., Wang, Y., Cao, Y., & Gong, T. (2023). Nanomedicine in Cancer Therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y

Feng, T., Tang, Z., Karges, J., Shen, J., Jin, C., Chen, Y., Pan, Y., He, Y., Ji, L., & Chao, H. (2023). Exosome camouflaged coordination-assembled Iridium(III) photosensitizers for apoptosis-autophagy-ferroptosis induced combination therapy against melanoma. *Biomaterials*, *301*, 122212. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122212

Fiori, F., Moukham, H., Olia, F., Ledda, S., Salis, A., Stagi, L., Malfatti, L., & Innocenzi, P. (2022). Highly Photostable Carbon Dots From Citric Acid for Bioimaging. *Materials*. https://doi.org/10.3390/ma15072395

Forterre, A. V, Wang, J.-H., Delcayre, A., Kim, K., Green, C., Pegram, M. D., Jeffrey, S. S., & Matin, A. C. (2020). Extracellular Vesicle–Mediated In Vitro Transcribed mRNA Delivery for Treatment

of HER2+ Breast Cancer Xenografts in Mice by Prodrug CB1954 without General Toxicity. *Molecular Cancer Therapeutics*, *19*(3), 858–867. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-19-0928

Francia, V., Montizaan, D., & Salvati, A. (2020). Interactions at the cell membrane and pathways of internalization of nano-sized materials for nanomedicine. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, *11*, 338–353. https://doi.org/10.3762/bjnano.11.25

Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *7*(null), 5577–5591. https://doi.org/10.2147/IJN.S36111

Fu, S., Wang, Y., Xia, X., & Zheng, J. C. (2020). Exosome engineering: Current progress in cargo loading and targeted delivery. *NanoImpact*, *20*, 100261. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100261

Fuhrmann, G., Serio, A., Mazo, M., Nair, R., & Stevens, M. M. (2015). Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release*, *205*, 35–44. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.029

García-Álvarez, R., Hadjidemetriou, M., Sánchez-Iglesias, A., Liz-Marzán, L. M., & Kostarelos, K. (2018). <i>In Vivo</I> Formation of Protein Corona on Gold Nanoparticles. The Effect of Their Size and Shape. *Nanoscale*. https://doi.org/10.1039/c7nr08322j

Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *482*(3), 419–425. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086

Gedda, G., Sankaranarayanan, S. A., Putta, C. L., Gudimella, K. K., Rengan, A. K., & Girma, W. M. (2023). Green Synthesis of Multi-Functional Carbon Dots From Medicinal Plant Leaves for Antimicrobial, Antioxidant, and Bioimaging Applications. *Scientific Reports*. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33652-8

Gerritzen, M. J. H., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Stork, M. (2017). High Throughput Nanoparticle Tracking Analysis for Monitoring Outer Membrane Vesicle Production. *Journal of Extracellular Vesicles*, *6*(1). https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1333883

Ghirardello, M., Shyam, R., & Galan, M. C. (2022). Reengineering of Cancer Cell Surface Charges Can Modulate Cell Migration. *Chemical Communications*, *58*(36), 5522–5525. https://doi.org/10.1039/d2cc00402j

Gonda, A., Moyron, R. B., Kabagwira, J., Vallejos, P., & Wall, N. R. (2020). *Cellular-Defined Microenvironmental Internalization of Exosomes*. https://doi.org/10.5772/intechopen.86020

Gupta, Deepshikha, Roy, P., Sharma, R., Kasana, R., Rathore, P., & Gupta, T. K. (2024). Recent Nanotheranostic Approaches in Cancer Research. *Clinical and Experimental Medicine*.

https://doi.org/10.1007/s10238-023-01262-3

Gupta, Dhanu, Zickler, A. M., & El Andaloussi, S. (2021). Dosing extracellular vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *178*, 113961. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113961

Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Communication and Signaling*, *19*(1), 47. https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1

Hao, S. C., Ma, H., Niu, Z. F., Sun, S. Y., Zou, Y. R., & Xia, H. C. (2019). HUC-MSCs secreted exosomes inhibit the glioma cell progression through PTENP1/MIR-10a-5p/PTEN pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *23*(22), 10013–10023. https://doi.org/10.26355/EURREV_201911_19568

Harish, V., Ansari, M. M., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., García-Betancourt, M.-L., Abdel-Haleem, F. M., Bechelany, M., & Barhoum, A. (2022). Nanoparticle and Nanostructure Synthesis and Controlled Growth Methods. Içinde *Nanomaterials* (C. 12, Sayı 18). https://doi.org/10.3390/nano12183226

Hass, R., Ohe, J. von der, & Ungefroren, H. (2020). Impact of the Tumor Microenvironment on Tumor Heterogeneity and Consequences for Cancer Cell Plasticity and Stemness. *Cancers*. https://doi.org/10.3390/cancers12123716

Havrdova, M., Hola, K., Skopalik, J., Tomankova, K., Petr, M., Cepe, K., Polakova, K., Tucek, J., Bourlinos, A. B., & Zboril, R. (2016). Toxicity of carbon dots – Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon*, *99*, 238–248. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.027

Heath, N., Osteikoetxea, X., de Oliveria, T. M., Lázaro-Ibáñez, E., Shatnyeva, O., Schindler, C., Tigue, N., Mayr, L. M., Dekker, N., Overman, R., & Davies, R. (2019). Endosomal Escape Enhancing Compounds Facilitate Functional Delivery of Extracellular Vesicle Cargo. *Nanomedicine*, *14*(21), 2799–2814. https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0061

Heidarzadeh, M., Zarebkohan, A., Rahbarghazi, R., & Sokullu, E. (2023). Protein corona and exosomes: new challenges and prospects. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1), 64. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01089-1

Helleday, T., & Rudd, S. G. (2022). Targeting the DNA damage response and repair in cancer through nucleotide metabolism. *Molecular Oncology*, *16*(21), 3792–3810. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1878-0261.13227

Hood, J. L., Scott, M. J., & Wickline, S. A. (2014). Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. *Analytical Biochemistry*, *448*, 41–49. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.001

Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M. T., Molina, H., Kohsaka, S., Giannatale, A. Di, Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmer,

L. A., King, T. A., Bojmar, L., Davies, A. E., Ararso, Y., … Lyden, D. (2015). Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis. *Nature*. https://doi.org/10.1038/nature15756

Huang, J., Zhang, G., Li, S., Li, J., Wang, W., Xue, J., Wang, Y., Fang, M., & Zhou, N. (2023). Endothelial Cell-Derived Exosomes Boost and Maintain Repair-Related Phenotypes of Schwann Cells via miR199-5p to Promote Nerve Regeneration. *Journal of Nanobiotechnology*. https://doi.org/10.1186/s12951-023-01767-9

Hyun, J., Wang, S., Kim, J., Kim, G. J., & Jung, Y. (2015). MicroRNA125b-mediated Hedgehog signaling influences liver regeneration by chorionic plate-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, *5*(1), 14135. https://doi.org/10.1038/srep14135

Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., & Baptista, M. S. (2014). Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophysical Reviews*, *6*(1), 47–61. https://doi.org/10.1007/s12551-013-0128-9

Izci, M., Maksoudian, C., Manshian, B. B., & Soenen, S. J. (2021). The Use of Alternative Strategies for Enhanced Nanoparticle Delivery to Solid Tumors. *Chemical Reviews*. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00779

Ji, S., Ma, P., Cao, X., Wang, J., Yu, X., Luo, X., Lu, J., Hou, W., Zhang, Z., Yan, Y., Dong, Y., & Wang, H. (2022). Myoblast-derived exosomes promote the repair and regeneration of injured skeletal muscle in mice. *FEBS Open Bio*, *12*(12), 2213–2226. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/2211-5463.13504

Jia, G., Han, Y., An, Y., Ding, Y., He, C., Wang, X., & Tang, Q. (2018). NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo. *Biomaterials*, *178*, 302–316. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.029

Jiang, B., Yang, H., Guo, Y., Liu, C., Song, H., Panpan, Z., Zhang, H., Zhou, K., Guo, Y., & Chen, H. (2022). Developing Electropositive Citric Acid–polyethylenimine Carbon Quantum Dots With High Biocompatibility and Labeling Performance for Mesenchymal Stem Cells <i>in Vitro</I> and <i>in Vivo</I>. *New Journal of Chemistry*. https://doi.org/10.1039/d1nj04990a

Jiang, L., Zhang, Y., Guo, L., Liu, C., Wang, P., & Ren, W. (2021). Exosomal microRNA-107 reverses chemotherapeutic drug resistance of gastric cancer cells through HMGA2/mTOR/P-gp pathway. *BMC Cancer*, *21*(1), 1290. https://doi.org/10.1186/s12885-021-09020-y

Jin, J.-C., Yu, Y., Yan, R., Cai, S.-L., Zhang, X.-Y., Jiang, F.-L., & Liu, Y. (2021). N,S-Codoped Carbon Dots with Red Fluorescence and Their Cellular Imaging. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(6), 4973–4981. https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00242

Jing, H. H., Shati, A. A., Alfaifi, M. Y., Elbehairi, S. E. I., & Sasidharan, S. (2024). The future of plant based green carbon dots as cancer Nanomedicine: From current progress to future Perspectives and beyond. *Journal of Advanced Research*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.01.034

Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 262. https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8

Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, *367*(6478), eaau6977. https://doi.org/10.1126/science.aau6977

Kang, T., Wu, X., Wang, F., Shi, Y., Wei, F., Dong, M., Xiao, S., Qian, Y., Zha, M., Li, C., Chen, F., & Li, K. (2024). Ir(III)-Based Photosensitizer-Loaded M1 Macrophage Exosomes for Synergistic Photodynamic Therapy. *Advanced Functional Materials*, *n/a*(n/a), 2408142. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.202408142

Kar, R., Dhar, R., Mukherjee, S., Nag, S., Gorai, S., Mukerjee, N., Mukherjee, D., Vatsa, R., Jadhav, M., Ghosh, A., Devi, A., Anand, K., & Thorat, N. D. (2023). Exosome-Based Smart Drug Delivery Tool for Cancer Theranostics. *Acs Biomaterials Science & Engineering*. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c01329

Kashyap, B. K., Singh, V. V., Solanki, M. K., Kumar, A., Ruokolainen, J., & Kesari, K. K. (2023). Smart Nanomaterials in Cancer Theranostics: Challenges and Opportunities. *ACS Omega*, *8*(16), 14290–14320. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07840

Kaushik, A. C., Wu, Q., Lin, L., Li, H., Zhao, L., Wen, Z., Song, Y., Wu, Q., Wang, J., Guo, X., Wang, H., Yu, X., Wei, D., & Zhang, S. (2021). Exosomal ncRNAs profiling of mycobacterial infection identified miRNA-185-5p as a novel biomarker for tuberculosis. *Briefings in Bioinformatics*, *22*(6), bbab210. https://doi.org/10.1093/bib/bbab210

Kazaryan, S., Farsiyan, L., Tumoyan, J., Kirakosyan, G., Ayvazyan, N., Gasparyan, H., Buloyan, S., Arshakyan, L., Kirakosyan, A., & Hovhannisyan, A. (2022). Oxidative stress and histopathological changes in several organs of mice injected with biogenic silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *50*(1), 331–342. https://doi.org/10.1080/21691401.2022.2149931

Kiio, T. M., & Park, S. (2021). Physical properties of nanoparticles do matter. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, *51*(1), 35–51. https://doi.org/10.1007/s40005-020-00504-w

Kim, H., Kim, E. H., Kwak, G., Gil, S., Kim, S. H., & Yang, Y. (2020). Exosomes: Cell-Derived Nanoplatforms for the Delivery of Cancer Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. https://doi.org/10.3390/ijms22010014

Kim, M. S., Haney, M. J., Zhao, Y., Mahajan, V., Deygen, I., Klyachko, N. L., Inskoe, E., Piroyan, A., Sokolsky, M., Okolie, O., Hingtgen, S. D., Kabanov, A. V, & Batrakova, E. V. (2016). Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *12*(3), 655–664. https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012

Kim, Y. G., Choi, J., & Kim, K. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes for Effective

Cartilage Tissue Repair and Treatment of Osteoarthritis. *Biotechnology Journal*, *15*(12), 2000082. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.202000082

Kimura, K., Hohjoh, H., Fukuoka, M., Sato, W., Oki, S., Tomi, C., Yamaguchi, H., Kondo, T., Takahashi, R., & Yamamura, T. (2018). Circulating Exosomes Suppress the Induction of Regulatory T Cells via Let-7i in Multiple Sclerosis. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02406-2

Kirbas Cilingir, E., Besbinar, O., Giro, L., Bartoli, M., Hueso, J. L., Mintz, K. J., Aydogan, Y., Garber, J. M., Turktas, M., Ekim, O., Ceylan, A., Unal, M. A., Ensoy, M., Arı, F., Ozgenç Çinar, O., Ozturk, B. I., Gokce, C., Cansaran-Duman, D., Braun, M., … Leblanc, R. M. (2024). Small Warriors of Nature: Novel Red Emissive Chlorophyllin Carbon Dots Harnessing Fenton-Fueled Ferroptosis for In Vitro and In Vivo Cancer Treatment. *Small*, *n/a*(n/a), 2309283. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.202309283

Kirbas Cilingir, E., Seven, E. S., Zhou, Y., Walters, B. M., Mintz, K. J., Pandey, R. R., Wikramanayake, A. H., Chusuei, C. C., Vanni, S., Graham, R. M., & Leblanc, R. M. (2021). Metformin derived carbon dots: Highly biocompatible fluorescent nanomaterials as mitochondrial targeting and blood-brain barrier penetrating biomarkers. *Journal of Colloid and Interface Science*, *592*, 485–497. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.058

Kourtzelis, I., Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2020). Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00553

Krylova, S. V, & Feng, D. (2023). The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. *International Journal of Molecular Sciences*. https://doi.org/10.3390/ijms24021337

Kumar, M. A., Baba, S. K., Sadida, H. Q., Marzooqi, S. A., Jerobin, J., Altemani, F. H., Algehainy, N., Alanazi, M. A., Abou-Samra, A.-B., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, A. S., Macha, M. A., Mir, R., & Bhat, A. A. (2024). Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 27. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1

Kurtzwald-Josefson, E., Zeevi-Levin, N., Rubchevsky, V., Erdman, N. B., Rohaker, O. S., Nahum, O., Hochhauser, E., Ben-Avraham, B., Itskovitz-Eldor, J., Aravot, D., & Barac, Y. D. (2020). Cardiac Fibroblast-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Exosomes as a Potential Therapeutic Mean for Heart Failure. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:222157414

Lamprecht, C., Gierlinger, N., Heister, E., Unterauer, B., Plochberger, B., Brameshuber, M., Hinterdorfer, P., Hild, S., & Ebner, A. (2012). Mapping the intracellular distribution of carbon nanotubes after targeted delivery to carcinoma cells using confocal Raman imaging as a label-free technique *. *Journal of Physics: Condensed Matter*, *24*(16), 164206. https://doi.org/10.1088/0953-8984/24/16/164206

Lara, P., Palma-Florez, S., Salas-Huenuleo, E., Polakovicova, I., Guerrero, S., Lobos-Gonzalez, L.,

Campos, A., Muñoz, L., Jorquera-Cordero, C., Varas-Godoy, M., Cancino, J., Arias, E., Villegas, J., Cruz, L. J., Albericio, F., Araya, E., Corvalan, A. H., Quest, A. F. G., & Kogan, M. J. (2020). Gold nanoparticle based double-labeling of melanoma extracellular vesicles to determine the specificity of uptake by cells and preferential accumulation in small metastatic lung tumors. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*(1), 1–17. https://doi.org/10.1186/s12951-020-0573-0

Lau, N. C. H., & Yam, J. W. P. (2023). From Exosome Biogenesis to Absorption: Key Takeaways for Cancer Research. *Cancers*. https://doi.org/10.3390/cancers15071992

Ledesma, F., Ozcan, B., Sun, X., Medina, S. M., & Landry, M. P. (2022). Nanomaterial Strategies for Delivery of Therapeutic Cargoes. *Advanced Functional Materials*, *32*(4), 2107174. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adfm.202107174

Lee, C.-H., Kwon, W., Beack, S., Lee, D.-H., Park, Y., Kim, H. M., Hahn, S. K., Rhee, S., & Kim, C. (2016). Biodegradable Nitrogen-Doped Carbon Nanodots for Non-Invasive Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy. *Theranostics*. https://doi.org/10.7150/thno.16923

Li, C., Qin, S., Wen, Y., Zhao, W., Huang, Y., & Liu, J. (2022). Overcoming the blood-brain barrier: Exosomes as theranostic nanocarriers for precision neuroimaging. *Journal of Controlled Release*, *349*, 902–916. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.08.002

Li, J., Kong, J., Ma, S., Li, J., Mao, M., Chen, K., Chen, Z., Zhang, J., Chang, Y., Yuan, H., Liu, T., Zhang, Z., & Xing, G. (2021). Exosome-Coated <sup>10</Sup>B Carbon Dots for Precise Boron Neutron Capture Therapy in a Mouse Model of Glioma in Situ. *Advanced Functional Materials*. https://doi.org/10.1002/adfm.202100969

Li, L. J., Gu, Y. J., Wang, L. Q., Wan, W., Wang, H. W., Yang, X. N., Ma, L. L., Yang, L. H., & Meng, Z. H. (2021). Serum exosomal microRNA-146a as a novel diagnostic biomarker for acute coronary syndrome. *Journal of thoracic disease*, *13*(5), 3105–3114. https://doi.org/10.21037/JTD-21-609

Li, L., Zhang, Y., Mu, J., Chen, J., Zhang, C., H, C., & J, G. (2020). Transplantation of Human Mesenchymal Stem-Cell-Derived Exosomes Immobilized in an Adhesive Hydrogel for Effective Treatment of Spinal Cord Injury. *Nano Letters*. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c00929

Li, M., Yin, S., Xu, A., Kang, L., Ma, Z., Liu, F., Yang, T., Sun, P., & Tang, Y. (2024). Synergistic Phototherapy-Molecular Targeted Therapy Combined with Tumor Exosome Nanoparticles for Oral Squamous Cell Carcinoma Treatment. Içinde *Pharmaceutics* (C. 16, Sayı 1). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010033

Li, Xue, Wang, B., Zhou, S., Chen, W., Chen, H., Liang, S., Zheng, L., Yu, H., Chu, R., Wang, M., Chai, Z., & Feng, W. (2020). Surface chemistry governs the sub-organ transfer, clearance and toxicity of functional gold nanoparticles in the liver and kidney. *Journal of Nanobiotechnology*, *18*(1), 45. https://doi.org/10.1186/s12951-020-00599-1

Li, Xueting, Yu, L., He, M., Chen, C., Yu, Z., Jiang, S., Wang, Y., Li, L., Li, B., Wang, G., Shen, A.,

& Fan, J. (2023). Review on carbon dots: Synthesis and application in biology field. *BMEMat*, *1*(4), e12045. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bmm2.12045

Li, Y., Du, Y., Zhou, Y., Chen, Q., Luo, Z., Ren, Y., Chen, X., & Chen, G. (2023). Iron and Copper: Critical Executioners of Ferroptosis, Cuproptosis and Other Forms of Cell Death. *Cell Communication and Signaling*, *21*(1). https://doi.org/10.1186/s12964-023-01267-1

Liang, W., Chen, X., Zhang, S., Fang, J., Chen, M., Xu, Y., & Chen, X. (2021). Mesenchymal Stem Cells as a Double-Edged Sword in Tumor Growth: Focusing on MSC-derived Cytokines. *Cellular & Molecular Biology Letters*. https://doi.org/10.1186/s11658-020-00246-5

Lin, T., Zha, Y., Zhang, X., Chen, J., Li, Y., Wang, Z., Zhang, S., Wang, J., & Li, Z. (2020). Gene-activated engineered exosome directs osteoblastic differentiation of progenitor cells and induces vascularized osteogenesis in situ. *Chemical Engineering Journal*, *400*, 125939. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125939

Liu, H., Zhong, X., Pan, Q., Zhang, Y., Deng, W., Zou, G., Hou, H., & Ji, X. (2024). A review of carbon dots in synthesis strategy. *Coordination Chemistry Reviews*, *498*, 215468. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215468

Liu, J., Zhang, J., Song, K., Du, J., Wang, X., Liu, J., Li, B., Ouyang, R., Miao, Y., Sun, Y., & Li, Y. (2021). Tumor Microenvironment Modulation Platform Based on Composite Biodegradable Bismuth–Manganese Radiosensitizer for Inhibiting Radioresistant Hypoxic Tumors. *Small*. https://doi.org/10.1002/smll.202101015

Liu, R., Zhang, L., Zhao, J., Hou, C., Huang, Y., Huang, Z., & Zhao, S. (2019). A Distinctive Spinach-Based Carbon Nanomaterial with Chlorophyll-Rich and Near-Infrared Emission for Simultaneous In Vivo Biothiol Imaging and Dual-Enhanced Photodynamic Therapy of Tumor. *Advanced Therapeutics*, *2*(7), 1900011. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adtp.201900011

Liu, T., Zhu, Y., Zhao, R., Wei, X., & Xin, X. (2020). Visualization of exosomes from mesenchymal stem cells in vivo by magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, *68*, 75–82. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mri.2020.02.001

Liu, Weijiang, Zhou, N., Liu, Y., Zhang, W., Li, X., Wang, Y., Zheng, R., & Zhang, Y. (2021). Mesenchymal stem cell exosome-derived miR-223 alleviates acute graft-versus-host disease via reducing the migration of donor T cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 153. https://doi.org/10.1186/s13287-021-02159-2

Liu, Wenxu, Wei, L., Li, M., & Mo, J. (2023). Zinc sulfide-based hybrid exosome-coated nanoplatform for targeted treatment of glioblastoma in an orthotopic mouse glioblastoma model. *Materials Today Advances*, *17*, 100327. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2022.100327

Liu, Y., Yi, Y., Zhong, C., Ma, Z., Wang, H., Dong, X., Ye, F., Li, J., Chen, Q., Lin, C., & Li, X. (2023). Advanced Bioactive Nanomaterials for Diagnosis and Treatment of Major Chronic Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1121429

Lopes, D., Lopes, J., Pereira-Silva, M., Peixoto, D., Rabiee, N., Veiga, F., Moradi, O., Guo, Z., Wang, X., Conde, J. P., Makvandi, P., & Paiva-Santos, A. C. (2023). Bioengineered Exosomal-Membrane-Camouflaged Abiotic Nanocarriers: Neurodegenerative Diseases, Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Military Medical Research*. https://doi.org/10.1186/s40779-023-00453-z

Mandal, T., Mishra, S. R., & Singh, V. (2023). Comprehensive Advances in the Synthesis, Fluorescence Mechanism and Multifunctional Applications of Red-Emitting Carbon Nanomaterials. *Nanoscale Advances*, *5*(21), 5717–5765. https://doi.org/10.1039/d3na00447c

Marjani, A. A., Nader, N. D., & Aghanejad, A. (2024). Exosomes as targeted diagnostic biomarkers: Recent studies and trends. *Life Sciences*, *354*, 122985. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122985

Mathivanan, S., Fahner, C. J., Reid, G. E., & Simpson, R. J. (2011). ExoCarta 2012: Database of Exosomal Proteins, RNA and Lipids. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkr828

Mead, B., & Tomarev, S. I. (2017). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Promote Survival of Retinal Ganglion Cells Through miRNA-Dependent Mechanisms. *Stem Cells Translational Medicine*. https://doi.org/10.1002/sctm.16-0428

Michael, P. L., Lam, Y. T., Hung, J., Tan, R. P., Santos, M., & Wise, S. G. (2021). Comprehensive Evaluation of the Toxicity and Biosafety of Plasma Polymerized Nanoparticles. Içinde *Nanomaterials* (C. 11, Sayı 5). https://doi.org/10.3390/nano11051176

Miguel, T. B. A. R., Pinheiro, S. K. de P., & de Castro Miguel, E. (2021). *Interaction of Nanomaterials with Biological Systems BT - Nanomaterials and Nanotechnology: Biomedical, Environmental, and Industrial Applications* (R. F. do Nascimento, V. de O. S. Neto, P. B. A. Fechine, & P. de T. C. Freire (ed.); ss. 375–409). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6056-3_12

Ming-Kun, C., Zi-Xian, C., Mao-Ping, C., Hong, C., Zhuang-Fei, C., & Shan-Chao, Z. (2024). Engineered extracellular vesicles: A new approach for targeted therapy of tumors and overcoming drug resistance. *Cancer Communications*, *44*(2), 205–225. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cac2.12518

Mishra, S., Shelar, S. B., Barick, K. C., Hassan, P. A., & Agarwal, N. (2024). High Singlet Oxygen Generating Benzothienyl-[b]-fused BODIPY Nanoaggregates and Photoinduced Apoptosis in Human Carcinoma. *ChemistrySelect*, *9*(14), e202400894. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/slct.202400894

Moghadasi, S., Elveny, M., Rahman, H. S., Suksatan, W., Jalil, A. T., Abdelbasset, W. K., Yumashev, A. V., Shariatzadeh, S., Motavalli, R., Behzad, F., Marofi, F., Hassanzadeh, A., Pathak, Y., & Jarahian, M. (2021). A Paradigm Shift in Cell-Free Approach: The Emerging Role of MSCs-derived Exosomes in Regenerative Medicine. *Journal of Translational Medicine*. https://doi.org/10.1186/s12967-021-02980-6

Mohammadinejad, R., Dadashzadeh, A., Moghassemi, S., Ashrafizadeh, M., Dehshahri, A., Pardakhty, A., Sassan, H., & Sohrevardi, S. M. (2019). Shedding Light on Gene Therapy: Carbon Dots for the Minimally Invasive Image-Guided Delivery of Plasmids and Noncoding RNAs - A Review. *Journal of Advanced Research*. https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.01.004

Mohsin, A., Hussain, M. H., Mohsin, M., Zaman, W. Q., Aslam, M. S., Shan, A., Dai, Y., Khan, I. M., Niazi, S., Zhuang, Y., & Guo, M. (2022). Recent Advances of Magnetic Nanomaterials for Bioimaging, Drug Delivery, and Cell Therapy. *Acs Applied Nano Materials*, *5*(8), 10118–10136. https://doi.org/10.1021/acsanm.2c02014

Moloudi, K., Abrahamse, H., & George, B. P. (2023). Photodynamic therapy induced cell cycle arrest and cancer cell synchronization: review. *Frontiers in Oncology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1225694

Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W. J., Beer-Stolz, D., & Vujanovic, N. L. (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *OncoImmunology*, *1*(7), 1074–1083. https://doi.org/10.4161/onci.20897

Muraoka, S., DeLeo, A. M., Sethi, M. K., Yukawa-Takamatsu, K., Yang, Z., Ko, J., Hogan, J. D., Ruan, Z., You, Y., Wang, Y., Medalla, M., Ikezu, S., Chen, M., Xia, W., Gorantla, S., Gendelman, H. E., Issadore, D., Zaia, J., & Ikezu, T. (2020). Proteomic and biological profiling of extracellular vesicles from Alzheimer's disease human brain tissues. *Alzheimer's & Dementia*, *16*(6), 896–907. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/alz.12089

naseri, Z., Oskuee, R. K., forouzandeh-moghadam, M., & Jaafari, M. R. (2020). Delivery of LNA-antimiR-142-3p by Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes to Breast Cancer Stem Cells Reduces Tumorigenicity. *Stem Cell Reviews and Reports*, *16*(3), 541–556. https://doi.org/10.1007/s12015-019-09944-w

Niel, G. van, D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125

Nocito, G., Calabrese, G., Forte, S., Petralia, S., Puglisi, C., Campolo, M., Esposito, E., & Conoci, S. (2021). Carbon Dots as Promising Tools for Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancers*. https://doi.org/10.3390/cancers13091991

O'Brien, K. P., Ughetto, S., Mahjoum, S., Nair, A. V, & Breakefield, X. O. (2022). Uptake, Functionality, and Re-Release of Extracellular Vesicle-Encapsulated Cargo. *Cell Reports*. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110651

Ozyurt, D., Kobaisi, M. Al, Hocking, R. K., & Fox, B. (2023). Properties, Synthesis, and Applications of Carbon Dots: A Review. *Carbon Trends*, *12*, 100276. https://doi.org/10.1016/j.cartre.2023.100276

Padinharayil, H., Varghese, J., Wilson, C., & George, A. (2024). Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Characteristics and applications in disease pathology and management. *Life Sciences*,

*342*, 122542. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122542

Pan, S., Pei, L., Zhang, A., Zhang, Y., Zhang, C., Huang, M., Huang, Z., Liu, B., Wang, L., Ma, L., Zhang, Q., & Cui, D. (2020). Passion fruit-like exosome-PMA/Au-BSA@Ce6 nanovehicles for real-time fluorescence imaging and enhanced targeted photodynamic therapy with deep penetration and superior retention behavior in tumor. *Biomaterials*, *230*, 119606. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119606

Peak, T. C., Praharaj, P. P., Panigrahi, G. K., Doyle, M., Su, Y., Schlaepfer, I. R., Singh, R., Vander Griend, D. J., Alickson, J., Hemal, A., Atala, A., & Deep, G. (2018). Exosomes secreted by placental stem cells selectively inhibit growth of aggressive prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *499*(4), 1004–1010. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.038

Perini, G., Palmieri, V., Ciasca, G., D'Ascenzo, M., Gervasoni, J., Primiano, A., Rinaldi, M., Fioretti, D. P., Prampolini, C., Tiberio, F., Lattanzi, W., Parolini, O., Spirito, M., & Papi, M. (2020). Graphene Quantum Dots' Surface Chemistry Modulates the Sensitivity of Glioblastoma Cells to Chemotherapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6301. https://doi.org/10.3390/ijms21176301

Pham, T. C., Jayasinghe, M. K., Pham, T. T., Yang, Y., Wei, L., Usman, W. M., Chen, H., Pirisinu, M., Gong, J., Kim, S., Peng, B., Wang, W., Chan, C., Ma, V., Nguyen, N. T. H., Kappei, D., Nguyen, X.-H., Cho, W. C., Shi, J., & Le, M. T. N. (2021). Covalent conjugation of extracellular vesicles with peptides and nanobodies for targeted therapeutic delivery. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(4), e12057. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jev2.12057

Polanco, J. C., Hand, G. R., Briner, A., Li, C., & Götz, J. (2021). Exosomes Induce Endolysosomal Permeabilization as a Gateway by Which Exosomal Tau Seeds Escape Into the Cytosol. *Acta Neuropathologica*. https://doi.org/10.1007/s00401-020-02254-3

Pullan, J. E., Confeld, M. I., Osborn, J. K., Kim, J., Sarkar, K., & Mallik, S. (2019). Exosomes as Drug Carriers for Cancer Therapy. *Molecular Pharmaceutics*, *16*(5), 1789–1798. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00104

Pužar Dominkuš, P., Stenovec, M., Sitar, S., Lasič, E., Zorec, R., Plemenitaš, A., Žagar, E., Kreft, M., & Lenassi, M. (2018). PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1860*(6), 1350–1361. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.013

Qi, H., Qiu, L., Zhang, X., Yi, T., Jing, J., Sami, R., Alanazi, S. F., Alqahtani, Z., Aljabri, M. D., & Rahman, M. M. (2023). Novel N-Doped Carbon Dots Derived From Citric Acid and Urea: Fluorescent Sensing for Determination of Metronidazole and Cytotoxicity Studies. *RSC Advances*. https://doi.org/10.1039/d2ra07150a

Qi, Y., Yao, Q., Li, X., Li, X., Zhang, W., & Qu, P. (2023). Cuproptosis-related gene SLC31A1: prognosis values and potential biological functions in cancer. *Scientific Reports*, *13*(1), 17790. https://doi.org/10.1038/s41598-023-44681-8

Qu, Q., Liu, L., Cui, Y., Chen, Y., Wang, Y., & Wang, Y. (2022). Exosomes from Human Omental Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Secreted into Ascites Promote Peritoneal Metastasis of Epithelial Ovarian Cancer. Içinde *Cells* (C. 11, Sayı 21). https://doi.org/10.3390/cells11213392

Reagen, S., Wu, Y., Shahni, R., Sun, W., Zhang, J., Chu, Q. R., Hou, X., Combs, C., & Zhao, J. X. (2022). Development of Red-Emissive Porphyrin Graphene Quantum Dots (PGQDs) for Biological Cell-Labeling Applications. *ACS Omega*, *7*(43), 38902–38911. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04623

Ribovski, L., Joshi, B. S., Gao, J., & Zuhorn, I. S. (2023). Breaking Free: Endocytosis and Endosomal Escape of Extracellular Vesicles. *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids*. https://doi.org/10.20517/evcna.2023.26

Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, *35*(7), 583–592. https://doi.org/10.1039/B502142C

Rojas, A., & Regev-Rudzki, N. (2024). Biogenesis of extracellular vesicles from the pathogen perspective: Transkingdom strategies for delivering messages. *Current Opinion in Cell Biology*, *88*, 102366. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102366

Roszkowski, S. (2024). Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes for regenerative medicine applications. *Clinical and Experimental Medicine*, *24*(1), 46. https://doi.org/10.1007/s10238-023-01282-z

Sadeghi, S., Tehrani, F. R., Tahmasebi, S., Shafiee, A., & Hashemi, S. M. (2023). Exosome engineering in cell therapy and drug delivery. *Inflammopharmacology*. https://doi.org/10.1007/s10787-022-01115-7

Sakdaronnarong, C., Sangjan, A., Boonsith, S., Kim, D. C., & Shin, H. S. (2020). Recent Developments in Synthesis and Photocatalytic Applications of Carbon Dots. Içinde *Catalysts* (C. 10, Sayı 3). https://doi.org/10.3390/catal10030320

Sancho-Albero, M., Encabo-Berzosa, M. del M., Beltrán-Visiedo, M., Fernández-Messina, L., Sebastián, V., Sánchez-Madrid, F., Arruebo, M., Santamaría, J., & Martín-Duque, P. (2019). Efficient encapsulation of theranostic nanoparticles in cell-derived exosomes: leveraging the exosomal biogenesis pathway to obtain hollow gold nanoparticle-hybrids. *Nanoscale*, *11*(40), 18825–18836. https://doi.org/10.1039/C9NR06183E

Sancho-Albero, M., Navascués, N., Mendoza, G., Sebastián, V., Arruebo, M., Martín-Duque, P., & Santamaría, J. (2019). Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. *Journal of Nanobiotechnology*, *17*(1), 16. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0437-z

Sang, R., Deng, F., Engel, A., Goldys, E., & Deng, W. (2022). Lipid-polymer nanocarrier platform enables X-ray induced photodynamic therapy against human colorectal cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *155*, 113837. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113837

Schrand, A. M., Schlager, J. J., Dai, L., & Hussain, S. M. (2010). Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *Nature Protocols*, *5*(4), 744–757. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.2

Seven, E. S., Seven, Y. B., Zhou, Y., Poudel-Sharma, S., Diaz-Rucco, J. J., Kirbas Cilingir, E., Mitchell, G. S., Van Dyken, J. D., & Leblanc, R. M. (2021). Crossing the blood–brain barrier with carbon dots: uptake mechanism and in vivo cargo delivery. *Nanoscale Adv.*, *3*(13), 3942–3953. https://doi.org/10.1039/D1NA00145K

Shafei, S., Khanmohammadi, M., Ghanbari, H., Nooshabadi, V. T., Tafti, S. H. A., Rabbani, S., Kasaiyan, M., Basiri, M., & Tavoosidana, G. (2022). Effectiveness of Exosome Mediated miR-126 and miR-146a Delivery on Cardiac Tissue Regeneration. *Cell and Tissue Research*. https://doi.org/10.1007/s00441-022-03663-4

Sharma, D., Singh, S., Kumar, P., Jain, G. K., Aggarwal, G., Almalki, W. H., & Kesharwani, P. (2023). 2 - Mechanisms of photodynamic therapy. Içinde P. B. T.-N. for P. T. Kesharwani (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Biomaterials* (ss. 41–54). Woodhead Publishing. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85595-2.00017-7

Sharma, R., Kumari, M., Mishra, S., Chaudhary, D. K., Kumar, A., Avni, B., & Tiwari, S. (2021). Exosomes Secreted by Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cell Attenuate Diabetes in Mice. *Journal of Diabetes Research*, *2021*, 9534574. https://doi.org/10.1155/2021/9534574

Sharma, V., & Mukhopadhyay, C. Das. (2024). Exosome as drug delivery system: Current advancements. *Extracellular Vesicle*, *3*, 100032. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vesic.2023.100032

Sheta, M., Taha, E. A., Lu, Y., & Eguchi, T. (2023). Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. Içinde *Biology* (C. 12, Sayı 1). https://doi.org/10.3390/biology12010110

Shi, Y., Du, L., Lin, L., & Wang, Y. (2016). Tumour-Associated Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Emerging Therapeutic Targets. *Nature Reviews Cancer*. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.193

Shojaei, S., Hashemi, S. M., Ghanbarian, H., Sharifi, K., Salehi, M., & Mohammadi-Yeganeh, S. (2021). Delivery of miR-381-3p Mimic by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Inhibits Triple Negative Breast Cancer Aggressiveness; an In Vitro Study. *Stem Cell Reviews and Reports*, *17*(3), 1027–1038. https://doi.org/10.1007/s12015-020-10089-4

Shukla, S., Currim, F., & Singh, K. (2023). Do Different Exosome Biogenesis Pathways and Selective Cargo Enrichment Contribute to Exosomal Heterogeneity? *Biology of the Cell*.

https://doi.org/10.1111/boc.202200116

Slepičková Kasálková, N., Slepička, P., & Švorčík, V. (2021). Carbon Nanostructures, Nanolayers, and Their Composites. Içinde *Nanomaterials* (C. 11, Sayı 9). https://doi.org/10.3390/nano11092368

Sousa, D. A., Ferreira, L. F. V., Fedorov, A. A., Rego, A. M. B. do, Ferraria, A. M., Cruz, A. B., Berberan-Santos, M. N., & Prata, J. V. (2022). Luminescent Carbon Dots From Wet Olive Pomace: Structural Insights, Photophysical Properties and Cytotoxicity. *Molecules*, *27*(19), 6768. https://doi.org/10.3390/molecules27196768

Sun, X., Zhao, P., Lin, J., Chen, K., & Shen, J. (2023). Recent Advances in Access to Overcome Cancer Drug Resistance by Nanocarrier Drug Delivery System. *Cancer Drug Resistance*, *6*(2), 390–415. https://doi.org/10.20517/cdr.2023.16

Taheri, M., Tehrani, H. A., Dehghani, S., Rajabzadeh, A., Alibolandi, M., Zamani, N., Arefian, E., & Ramezani, M. (2024). Signaling crosstalk between mesenchymal stem cells and tumor cells: Implications for tumor suppression or progression. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2024.01.004

Takaku, Y., Takehara, S., Suzuki, C., Suzuki, H., Shimomura, M., & Hariyama, T. (2020). In Situ Elemental Analyses of Living Biological Specimens Using 'NanoSuit' and EDS Methods in FE-SEM. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-71523-8

Tan, F., Li, X., Wang, Z., Li, J., Shahzad, K., & Zheng, J. (2024). Clinical Applications of Stem Cell-Derived Exosomes. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01704-0

Tanziela, T., Shaikh, S., Jiang, H., Lu, Z., & Wang, X. (2020). Efficient encapsulation of biocompatible nanoparticles in exosomes for cancer theranostics. *Nano Today*, *35*, 100964. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100964

Tian, F., Wang, P., Lin, D., Dai, J., Liu, Q., Guan, Y., Zhan, Y., Yang, Y., Wang, W., Wang, J., Liu, J., Zheng, L., Zhuang, Y., Hu, J., Wang, J., Kong, D., & Zhu, K. (2021). Exosome-delivered miR-221/222 exacerbates tumor liver metastasis by targeting SPINT1 in colorectal cancer. *Cancer Science*, *112*(9), 3744–3755. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cas.15028

Tischer, D., & Weiner, O. D. (2014). Illuminating cell signalling with optogenetic tools. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(8), 551–558. https://doi.org/10.1038/nrm3837

Tiwari, P., Shukla, R. P., Yadav, K., Singh, N., Marwaha, D., Gautam, S., Bakshi, A. K., Rai, N., Kumar, A., Sharma, D., & Mishra, P. R. (2024). Dacarbazine-primed carbon quantum dots coated with breast cancer cell-derived exosomes for improved breast cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, *365*, 43–59. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.11.005

Toda, Y., Takata, K., Nakagawa, Y., Kawakami, H., Fujioka, S., Kobayashi, K., Hattori, Y., Kitamura, Y., Akaji, K., & Ashihara, E. (2015). Effective internalization of U251-MG-secreted exosomes into cancer cells and characterization of their lipid components. *Biochemical and Biophysical*

*Research Communications*, *456*(3), 768–773. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.015

Truskewycz, A., Yin, H., Halberg, N., Lai, D. T. H., Ball, A. S., Truong, V. K., Rybicka, A. M., & Cole, I. (2022). Carbon Dot Therapeutic Platforms: Administration, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity, and Therapeutic Potential. *Small*, *18*(16), 2106342. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.202106342

Tsai, H., Wu, Y., Liu, X., Xu, Z., Liu, L., Wang, C., Zhang, H., Huang, Y., Wang, L., Zhang, W., Su, D., Khan, F. U., Zhu, X., Yang, R., Pang, Y., Eriksson, J. E., Zhu, H., Wang, D., Jia, B., … Chen, H. (2021). Engineered Small Extracellular Vesicles as a FGL1/PD-L1 Dual-Targeting Delivery System for Alleviating Immune Rejection. *Advanced Science*. https://doi.org/10.1002/advs.202102634

Tsvetkov, P., Detappe, A., Cai, K., Keys, H. R., Brune, Z., Ying, W., Thiru, P., Reidy, M., Kugener, G., Rossen, J., Kocak, M., Kory, N., Tsherniak, A., Santagata, S., Whitesell, L., Ghobrial, I. M., Markley, J. L., Lindquist, S., & Golub, T. R. (2019). Mitochondrial metabolism promotes adaptation to proteotoxic stress. *Nature Chemical Biology*, *15*(7), 681–689. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0291-9

Uprety, B., & Abrahamse, H. (2022). Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy: Recent advances. *Frontiers in Chemistry*, *10*. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.946574

Usman, M., Zaheer, Y., Younis, M. R., Demirdöğen, R. E., Hussain, S. Z., Sarwar, Y., Rehman, M., Khan, W. S., & Ihsan, A. (2020). The Effect of Surface Charge on Cellular Uptake and Inflammatory Behavior of Carbon Dots. *Colloids and Interface Science Communications*. https://doi.org/10.1016/j.colcom.2020.100243

Villarroya-Beltrí, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cófreces, N. B., Martínez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 Controls the Sorting of miRNAs Into Exosomes Through Binding to Specific Motifs. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1038/ncomms3980

Wang, H., Qiao, C., Guan, Q., Wei, M., & Li, Z. (2023). Nanoparticle-mediated synergistic anticancer effect of ferroptosis and photodynamic therapy: Novel insights and perspectives. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *18*(4), 100829. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajps.2023.100829

Wang, J., Liu, G., Leung, K. C., Loffroy, R., Lu, P.-X., & Wáng, Y. X. J. (2015). Opportunities and Challenges of Fluorescent Carbon Dots in Translational Optical Imaging. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(37), 5401–5416. https://doi.org/10.2174/1381612821666150917093232

Wang, W., Yang, B., Huang, Z., Huang, Y., Hu, P., Pan, X., & Wu, C. (2021). Investigating the Effect

of Particle Size on Cellular Uptake by Aggregation-Caused Quenching Probe–Encapsulating Solid Lipid Nanoparticles, Inhaled. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, *17*(4), 1109–1115. https://doi.org/10.1007/s12247-021-09576-z

Wei, F., Rees, T. W., Liao, X., Ji, L., & Chao, H. (2021). Oxygen Self-Sufficient Photodynamic Therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, *432*, 213714. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213714

Wei, H., Chen, Q., Lin, L., Sha, C., Li, T., Liu, Y., Yin, X., Xu, Y., Chen, L., Gao, W., Li, Y., & Zhu, X. (2021). Regulation of exosome production and cargo sorting. *Int J Biol Sci*, *17*, 163–177. https://doi.org/10.7150/ijbs.53671

Wei, Y., Jin, X., Kong, T., Zhang, W., & Zhu, B. (2019). The endocytic pathways of carbon dots in human adenoid cystic carcinoma cells. *Cell Proliferation*, *52*(3), e12586. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/cpr.12586

Wen, J., Creaven, D., Luan, X., & Wang, J. (2023). Comparison of immunotherapy mediated by apoptotic bodies, microvesicles and exosomes: apoptotic bodies' unique anti-inflammatory potential. *Journal of Translational Medicine*, *21*(1), 478. https://doi.org/10.1186/s12967-023-04342-w

Wu, D., Sun, H., Yang, B., Song, E., Song, Y., & Tan, W. (2024). Exosome Heterogeneity Affects the Distal "Barrier-Crossing" Trafficking of Exosome Encapsulated Quantum Dots. *ACS Nano*, *18*(11), 7907–7922. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c09378

Wu, H., Chen, Q., Wang, S., Yang, C., Xu, L., Xiao, H., Xie, T., & Pan, Q. (2024). Serum exosomes lncRNAs: TCONS_I2_00013502 and ENST00000363624 are new diagnostic markers for rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1419683

Wu, J.-Y., Li, Y.-J., Wang, J., Hu, X.-B., Huang, S., Luo, S., & Xiang, D.-X. (2021). Multifunctional exosome-mimetics for targeted anti-glioblastoma therapy by manipulating protein corona. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 405. https://doi.org/10.1186/s12951-021-01153-3

Wu, L., Wang, L., Liu, X., Bai, Y., Wu, R., Li, X., Mao, Y., Zhang, L., Zheng, Y., Gong, T., Zhang, Z., & Huang, Y. (2022). Milk-derived exosomes exhibit versatile effects for improved oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *12*(4), 2029–2042. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.12.015

Wu, Q., Miao, W., Zhang, Y., & Hui, D. (2020). Mechanical Properties of Nanomaterials: A Review. *Nanotechnology Reviews*. https://doi.org/10.1515/ntrev-2020-0021

Wu, Yahong, Yuan, W., Ding, H., & Wu, X. (2022). Serum exosomal miRNA from endometriosis patients correlates with disease severity. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *305*(1), 117–127. https://doi.org/10.1007/s00404-021-06227-z

Wu, Yanyan, Liu, C., Mei, H. C. van der, Busscher, H. J., & Ren, Y. (2021). Carbon Quantum Dots Derived From Different Carbon Sources for Antibacterial Applications. *Antibiotics*.

https://doi.org/10.3390/antibiotics10060623

Wu, Z., Li, W., Zhu, H., Li, X., Zhou, Y., Chen, Q., Huang, H., Zhang, W., Jiang, X., & Ren, C. (2023). Identification of cuproptosis-related subtypes and the development of a prognostic model in glioma. *Frontiers in Genetics*, *14*. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1124439

Xia, Q., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, X., Wu, X., Wang, Z., Yan, R., & Jin, Y. (2022). Copper Nanocrystalline-Doped Folic Acid-Based Super Carbon Dots for an Enhanced Antitumor Effect in Response to Tumor Microenvironment Stimuli. *Journal of Materials Chemistry B*, *10*(39), 8046–8057. https://doi.org/10.1039/d2tb01363k

Xia, Y., Duan, S., Han, C., Jing, C., Xiao, Z., & Li, C. (2022). Hypoxia-Responsive Nanomaterials for Tumor Imaging and Therapy. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1089446

Xiang, L., An, Z., Wu, X., Wang, J., Cai, S., Lu, Y., Li, L., Huang, W., Wu, D., Lu, L., Shi, S., Bi, H., & Kou, X. (2024). Carbon Dot-Loaded Apoptotic Vesicles Improve the Liver Kupffer Cell-Mediated Antibacterial Effect to Synergistically Alleviate Sepsis. *ACS Nano*, *18*(26), 16726–16742. https://doi.org/10.1021/acsnano.4c01780

Xie, C., Du, L.-Y., Guo, F., Li, X., & Cheng, B. (2019). Exosomes derived from microRNA-101-3p-overexpressing human bone marrow mesenchymal stem cells suppress oral cancer cell proliferation, invasion, and migration. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *458*(1), 11–26. https://doi.org/10.1007/s11010-019-03526-7

Xie, X., Ji, J., Chen, X., Xu, W., Chen, H., Zhu, S., Wu, J., Wu, Y., Sun, Y., Sai, W., Liu, Z., Xiao, M., & Bao, B. (2022). Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes carrying hsa-miRNA-128-3p suppress pancreatic ductal cell carcinoma by inhibiting Galectin-3. *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *24*(3), 517–531. https://doi.org/10.1007/s12094-021-02705-7

Xiong, Y., Xiao, C., Li, Z., & Yang, X. (2021). Engineering Nanomedicine for Glutathione Depletion-Augmented Cancer Therapy. *Chemical Society Reviews*, *50*(10), 6013–6041. https://doi.org/10.1039/d0cs00718h

Yadav, P., Shah, K., Kansara, K., Kumar, A., Rawal, R., & Bhatia, D. (2023). Tissue-Derived Primary Cell Type Dictates the Endocytic Uptake Route of Carbon Quantum Dots and <i>In Vivo</I> Uptake. *Acs Applied Bio Materials*. https://doi.org/10.1021/acsabm.3c00072

Yang, J., Chen, Z., Pan, D., Li, H., & Shen, J. (2020). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes combined pluronic F127 hydrogel promote chronic diabetic wound healing and complete skin regeneration. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 5911–5926. https://doi.org/10.2147/IJN.S249129

Yang, S., Chen, Z., Zhou, P., Xia, J., Deng, T., & Yu, C. (2023). Carbon dots based on endogenous

nutrients with visible and NIR fluorescence to penetrate blood-brain barrier. *Carbon*, *202*, 130–140. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.10.067

Younus, L. A., Mahmoud, Z. H., Hamza, A. A., Alaziz, K. M. A., Ali, M. L., Yasin, Y., Jihad, W. S., Rasheed, T., Alkhawaldeh, A. K., Ali, F. K., & Kianfar, E. (2024). Photodynamic Therapy in Cancer Treatment: Properties and Applications in Nanoparticles. *Brazilian Journal of Biology*. https://doi.org/10.1590/1519-6984.268892

Yu, L., Liu, Z., Xu, W., Jin, K., Liu, J., Zhu, X., Zhang, Y., & Wu, Y. (2024). Towards overcoming obstacles of type II photodynamic therapy: Endogenous production of light, photosensitizer, and oxygen. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *14*(3), 1111–1131. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.11.007

Yu, Q., Zhang, Y., Tian, Y., Peng, A., Cui, X., Ding, B., Yang, L., Liu, Y., Ju, Y., & Gao, C. (2024). Correction to: Exosomal Circ_FMN2 Derived from the Serum of Colorectal Cancer Patients Promotes Cancer Progression by miR-338-3p/MSI1 Axis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *196*(6), 3673. https://doi.org/10.1007/s12010-023-04722-4

Yuan, J., Chuanshan, X., Wingnang, L., Mei, L., Xiaowen, C., Huanhuan, G., Jiyong, Z., & Fanwen, Y. (2020). Role of Exosomes in Photodynamic Anticancer Therapy. Içinde *Current Medicinal Chemistry* (C. 27, Sayı 40, ss. 6815–6824). https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/0929867326666190918122221

Yue, X., Zhu, C., Gu, R., Hu, J., Xu, Y., Ye, S., & Zhu, J. (2022). Copper-Modified Double-Emission Carbon Dots for Rapid Detection of Thiophanate Methyl in Food. *Foods*, *11*(21), 3336. https://doi.org/10.3390/foods11213336

Zeng, H., Guo, S., Ren, X., Wu, Z., Liu, S., & Yao, X. (2023). Current Strategies for Exosome Cargo Loading and Targeting Delivery. Içinde *Cells* (C. 12, Sayı 10). https://doi.org/10.3390/cells12101416

Zhan, Q., Yi, K., Qi, H., Li, S., Li, X., Wang, Q., Wang, Y., Liu, C., Qiu, M., Yuan, X., Zhao, J., Hou, X., & Kang, C. (2020). Engineering blood exosomes for tumor-targeting efficient gene/chemo combination therapy. *Theranostics*, *10*(17), 7889–7905. https://doi.org/10.7150/thno.45028

Zhang, F., Guo, J., Zhang, Z., Qian, Y., Wang, G., Duan, M., Zhao, H., Yang, Z., & Jiang, X. (2022). Mesenchymal stem cell-derived exosome: A tumor regulator and carrier for targeted tumor therapy. *Cancer Letters*, *526*, 29–40. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.11.015

Zhang, P., Chen, D., Li, L., & Sun, K. (2022). Charge reversal nano-systems for tumor therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 31. https://doi.org/10.1186/s12951-021-01221-8

Zhang, R.-Y., Cheng, K., Huang, Z.-Y., Zhang, X.-S., Li, Y., Sun, X., Yang, X.-Q., Hu, Y.-G., Hou, X.-L., Liu, B., Chen, W., Fan, J.-X., & Zhao, Y.-D. (2024). M1 macrophage-derived exosome for reprograming M2 macrophages and combining endogenous NO gas therapy with enhanced photodynamic synergistic therapy in colorectal cancer. *Journal of Colloid and Interface Science*,

*654*, 612–625. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.10.054

Zhang, T., Lin, R., Wu, H., & Jiang, X. (2022). Mesenchymal Stem Cells: A Living Carrier for Active Tumor-Targeted Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114300

Zhang, W., Kandel, N., Zhou, Y., Smith, N., C.L.B. Ferreira, B., Perez, M., Claure, M. L., Mintz, K. J., Wang, C., & Leblanc, R. M. (2022). Drug delivery of memantine with carbon dots for Alzheimer's disease: blood–brain barrier penetration and inhibition of tau aggregation. *Journal of Colloid and Interface Science*, *617*, 20–31. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.02.124

Zhang, Y., Bai, Y., Jia, J., Gao, N., Li, Y., Zhang, R., Jiang, G., & Yan, B. (2014). Perturbation of physiological systems by nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, *43*(10), 3762–3809. https://doi.org/10.1039/C3CS60338E

Zhang, Z., Ding, C., Sun, T., Wang, L., & Chen, C. (2023). Tumor Therapy Strategies Based on Microenvironment-Specific Responsive Nanomaterials. *Advanced Healthcare Materials*. https://doi.org/10.1002/adhm.202300153

Zhao, C., Qiu, L., Wu, D., Zhang, M., Xia, W., Lv, H., & Cheng, L. (2024). Targeted reversal of multidrug resistance in ovarian cancer cells using exosome-encapsulated tetramethylpyrazine. *Mol Med Rep*, *29*(2), 25. https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13148

Zhao, J., Duan, L., Wang, A., Fei, J., & Li, J. (2020). Insight into the efficiency of oxygen introduced photodynamic therapy (PDT) and deep PDT against cancers with various assembled nanocarriers. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *12*(1), e1583. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wnan.1583

Zhao, L.-X., Chen, L.-L., Cheng, D., Wu, T.-Y., Fan, Y.-G., & Wang, Z.-Y. (2024). Potential Application Prospects of Biomolecule-Modified Two-Dimensional Chiral Nanomaterials in Biomedicine. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, *10*(4), 2022–2040. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.3c01871

Zhao, L., Gu, C., Gan, Y. H., Shao, L., Chen, H., & Zhu, H. (2020). Exosome-Mediated siRNA Delivery to Suppress Postoperative Breast Cancer Metastasis. *Journal of Controlled Release*. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.005

Zhao, R., Chen, X., Song, H., Bie, Q., & Zhang, B. (2020). Dual Role of MSC-Derived Exosomes in Tumor Development. *Stem Cells International*. https://doi.org/10.1155/2020/8844730

Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, *163*(5), 1064–1078. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.067

Zhou, G., Gu, Y., Zhu, Z., Zhang, H., Liu, W., Xu, B., Zhou, F., Zhang, M., Hua, K., Wu, L., & Ding, J. (2022). Exosome Mediated Cytosolic Cisplatin Delivery Through Clathrin-Independent Endocytosis and Enhanced Anti-Cancer Effect via Avoiding Endosome Trapping in Cisplatin-

Resistant Ovarian Cancer. *Frontiers in Medicine*. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.810761

Zhou, N., Zhu, S., Maharjan, S., Hao, Z., Song, Y., Zhao, X., Jiang, Y., Yang, B., & Lu, L. (2014). Elucidating the endocytosis, intracellular trafficking, and exocytosis of carbon dots in neural cells. *RSC Advances*, *4*(107), 62086–62095. https://doi.org/10.1039/C4RA09525A

Zhou, X., Hong, Y., Liu, Y., Wang, L., Liu, X., Li, Y., Yuan, H., & Hu, F. (2023). Intervening in hnRNPA2B1-mediated exosomal transfer of tumor-suppressive miR-184-3p for tumor microenvironment regulation and cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, *21*(1), 422. https://doi.org/10.1186/s12951-023-02190-w

Zhu, S., Huang, H., Liu, D., Wen, S., Shen, L., & Lin, Q. (2022). Augmented Cellular Uptake and Homologous Targeting of Exosome-Based Drug Loaded IOL for Posterior Capsular Opacification Prevention and Biosafety Improvement. *Bioactive Materials*. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.019

# EKLER

**EK-1.** Etik Kurul Kararı

Bilkent University

BİLKENT ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİH : 13.5.2024
TOPLANTI NO : 5
DOSYA NO : 10
KARAR NO : 2024/10

Doç.Dr. Açelya Yılmazer Aktuna'nın yürütücüsü olduğu **"Nanomalzeme Yüklü Kök Hücre Kaynakli Eksozomlarin Kanser Hücrelerinde Fotodinamik Terapi Etkisi"** başlıklı araştırma deney protokolü Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

Michelle Adams (Başkan) [redacted]

Özlen Konu Karakayalı (Üye) [redacted]

Bahar Değirmenci Uzun (Üye) [redacted]

Aytekin Akyol (Üye) [redacted]

Gamze Aykut (Üye) [redacted]

Necdet Karadoğan (Üye) [redacted]

# ÖZGEÇMİŞ

**Ömür BEŞBINAR**

1. **Öğrenim Durumu**

2. **Unvanları**

3. **Mesleki Deneyimi**

4. **Yayınlar**